

دارای رتبه علمی-پژوهشی از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

مقایسه حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره خام ناخالص جدایه های اکتینومیسیت فعال با داروهای تربینافین، گریزئوفولون، کتوکونازول و فلوکونازول علیه میکروسپوروم کانیس، میکروسپوروم جیستوم و تریکوفیتون متاگروفاپتیس در شرایط آزمایشگاهی

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 مهارکنندگی (MIC) از رشد عصاره خام ناخالص جدایه های اکتینومیسیت فعال با داروهای تربینافین، گریزئوفولون، کتوکونازول و فلوکونازول علیه میکروسپوروم کانیس، میکروسپوروم جیستوم و تریکوفیتون متاگروفاپتیس در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، جهت یافتن حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد توسط جدایه های اکتینومیسیت ابتدا ۱۰۰ جدایه از جنبه اثرات آنتاگونیستی مورد بررسی قرار گرفتند. سپس از جدایه های اکتینومیسیت 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 جیستوم و تریکوفیتون متاگروفاپتیس استفاده شد. همچنین از داروهای تربینافین، گریزئوفولون، کتوکونازول و فلوکونازول در حلال دی متیل سولفوکساید غلظت های مختلف تهیه و اثرات مهارکنندگی رشد هر کدام مورد ارزیابی و با نتایج بدست آمده از عصاره خام ناخالص جدایه های اکتینومیسیت فعال مورد مقایسه قرار گرفتند.

یافته ها: عصاره های خام ناخالص بدست آمده از جدایه های اکتینومیسیت فعال و داروهای تربینافین، گریزئوفولون، کتوکونازول و فلوکونازول رشد میکروسپوروم کانیس، میکروسپوروم جیستوم و تریکوفیتون متاگروفاپتیس را وابسته به غلظت مهار کردند.

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

واژه های کلیدی: عصاره خام ناخالص اکتینومیسیت، میکروسپوروم کانیس، میکروسپوروم جیستوم، تریکوفیتون متاگروفاپتیس، تربینافین

ناصر کیخا

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

سید امین آیت الهی 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

آدرس مقاله

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

مقدمه

درماتوفیت‌ها قارچ‌هایی هستند که توانایی حمله به بافت‌های کراتین دار بدن مانند پوست، مو و ناخن را دارند. عفونت‌های ایجاد شده توسط این ارگانیزم‌ها درماتوفیتوزیس نامیده می‌شود و شایع‌ترین بیماری‌های ایجاد شده توسط آنها کچلی پا، کچلی ناخن، کچلی بدن و کچلی سر می‌باشد (۲،۱). در میان داروهای ضد قارچی برای درمان درماتوفیتوزیس، گریزئوفلوکین 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 مزیت‌های عمده این داروهای جدید می‌توان به دوره کوتاه درمان، افزایش اثر دارو و کاهش سمیت این عوامل در مقایسه با گریزئوفلوکین اشاره کرد (۴،۳). گریزئوفلوکین و داروهای ضد قارچی جدیدتر مانند کتوکونازول، فلوکونازول و ترینافین داروهای اصلی در درمان درماتوفیتوزیس هستند. گریزئوفلوکین اولین داروی ضد قارچ سیستمیک بود ولی امروزه به طور گسترده استفاده نمی‌شود (۵). کتوکونازول اولین ایمیدازول خوراکی و فعال بر علیه درماتوفیتوزیس بوده ولی دوزهای بالای کتوکونازول ممکن است سطح تستوسترون و کورتیزول را کاهش دهد و در نتیجه ممکن باعث بی‌نظمی‌های قاعدگی در زنان و ناتوانی جنسی در مردان شود. همچنین مسمومیت کبدی نیز از عوارض جانبی شناخته شده این دارو می‌باشد (۷،۶). ترینافین دارای فعالیت بسیار بالایی بر علیه عفونت‌های درماتوفیتی بوده و مکانیسم آن مسدود کردن سنتز ارگوسترول می‌باشد (۸). ترینافین از دسته آل‌یل آمین‌ها بوده، از نظر ساختمانی شبیه نفتیفین است و یک عامل ضد قارچ صنعتی می‌باشد که بسیار لیپوفیل بوده و تمایل به تجمع در پوست، ناخن و بافت‌های چرب دارد (۸،۴). حدود ۴۰ سال، گریزئوفلوکین 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 ضعیف بودن داروهای ضد قارچی برای نفوذ به بافت جلدی بدن و ضعف فارماکوکینتیک دارو مشاهده شده است. اکتینومیسیت‌ها گروهی از باکتری‌های گرم مثبت متعلق به شاخه اکتینوباکتریاسه هستند. از جمله ترکیبات مترشحه

توسط اکتینومیسیت‌ها 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 اکتینومیسیت‌ها و عمدتاً توسط گونه‌های مختلف استرپتومایسس *Streptomyces* جدا شده‌اند (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 جدایه‌های اکتینومیسیت فعال با داروهای ترینافین، گریزئوفلوکین، کتوکونازول و فلوکونازول علیه میکروسپوروم کانیس، میکروسپوروم جیستوم و تریکوفیتون متاگروفایتیس 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 ۹۰ ml آب مقطر استریل مخلوط و روی شیکر دوار (۳۰ دقیقه و ۱۳۰ g) قرار داده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه به حالت ساکن رها شد و از مایع رویی مقدار ۱ ml برداشته و به لوله آزمایش محتوی ۹ ml آب مقطر استریل اضافه شد و بدین ترتیب غلظت 10^{-2} به دست آمد. به همین ترتیب، از طریق

هر پرگنه اکتینومیست، کشت خطی *Streak culture* بر روی محیط کشت CGA جدید، تهیه و نمونه‌های خالص در دمای 28°C انکوبه شدند. جهت نگهداری طولانی مدت 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 28°C انکوبه شدند (۱۱). پس از رشد پرگنه‌های اکتینومیست و اطمینان از آلوده نبودن آنها، لوله‌ها به دمای 4°C منتقل شدند. میکروسپورم جیپسوم (PTCC5057)، میکروسپوروم کانیس (PTCC5069) و تریکوفایتون متاگروفایتیس (PTCC5054) از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و عفونی وابسته به سازمان پژوهش‌های علمی-صنعتی ایران، تهیه شد. برای رشد این قارچ‌ها، محیط PDA ساخت شرکت Merck استفاده شد.

رقیق سازی متوالی مخلوط خاک، غلظت‌های 10^{-3} ، 10^{-4} ، 10^{-5} و 10^{-6} تهیه شد. برای جداسازی و رشد اکتینومیست‌ها، محیط کشت کازئین-گلیسرول-آگار (CGA) استفاده شد. جهت تهیه این محیط، ترکیبات موجود (جدول ۱) 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 121°C به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. سپس ۱ ml از رقت‌های متوالی 10^{-3} ، 10^{-4} ، 10^{-5} و 10^{-6} به دست آمده، در هر یک از پلیت‌های سترون، ریخته (هر رقت در سه تکرار) و مقدار ۲۰-۲۵ ml از محیط کشت CGA (در دمای تقریبی 45°C) به آن اضافه گردید. این پلیت‌ها در دمای 28°C انکوبه شدند (۱۱). پس از ۷-۱۰ روز انکوباسیون، پرگنه‌های اکتینومیست و همچنین برخی قارچ‌ها و باکتری‌ها، روی محیط ظاهر شد. از

جدول ۱- ترکیبات محیط کشت CGA (۱۵)

Ingredients	Amount
Casein	۰/۳ gr
KNO ₃	۲ gr
NaCl	۲ gr
K ₂ HPO ₄	۲ gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	۰/۰۵ gr
CaCO ₃	۰/۰۲ gr
FeSO ₄ .7H ₂ O	۰/۰۱ gr
Glycerol or Starch	۱۰ gr
Agar	۱۸ gr
Distilled water	۱ L
pH	۷/۲ تا ۷

کلنی‌ها آماده گردید (۱۲، ۱۳).

تهیه محلول دارویی جهت تعیین MIC: رقت‌های دارویی از چهار داروی تربینافین، گریزوفولون، کتوکونازول و فلوکونازول در غلظت‌های $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ ، $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ ، $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ و $0.1\text{ }\mu\text{g/ml}$ با استفاده از حلال دی‌متیل‌سولفوکساید و متانول، با نسبت حجمی ۱:۱، تهیه گردید. در ضمن به عنوان شاهد از غلظت دی‌متیل‌سولفوکساید و متانول استفاده شد و اثر سوئی بر رشد عوامل فوق در محیط کشت مشاهده نشد. در نهایت برای تعیین حساسیت هر یک از رقت‌های تهیه شده از داروها، ابتدا ۰/۱

تهیه مخلوط قارچی: برای این کار با سرم فیزیولوژی سترون از جدایه‌های 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 اسپورهای قارچی جداسازی و جمع‌آوری شدند. مخلوط حاوی اسپور در لوله‌های سترون جمع‌آوری شده و تعداد اسپورها در میلی لیتر با استفاده از لام نتوبار شمارش گردید. در انتها غلظتی معادل 10^3 cfu/ml از هر یک از گونه‌ها به دنبال انتقال حجم مشخصی از مخلوط‌های قارچی به محیط کشت پتیتو دکستروز آگار و شمارش تعداد

در مقدار سی 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 دی متیل سولفوکساید 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 میلی گرم در میلی لیتر از آن تهیه شد و آزمون آنتی بیوگرام به روش چاهک و میکرو دیالوژن در پلیت ۹۶ خانه علیه قارچ های مورد مطالعه انجام شد (۱۵).

یافته ها

جداسازی اکتینومیسیت ها از خاک: از رقت های ۱۰^{-۶} - ۱۰^{-۱} کشت خاک، بیش از ۱۰۰ جدایه اکتینومیسیت خاکری 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 اکتینومیسیت فعال معنا دار گزارش گردید ($P < 0/05$). نتایج حاصل از بررسی تاثیر غلظت های مختلف داروهای تربینافین، گریزئوفولین، کتوکونازول و فلوکونازول نشان داد که این داروها در تمامی غلظت های مورد استفاده در محدوده $100 - 0/001 \mu\text{g/ml}$ توانایی جلوگیری از رشد میکروسپوروم کانیس، میکروسپوروم جیستوم و تریکوفیتون متاگروفایتیس را دارند. MIC ایزوله های اکتینومیسیت 115، Ks10 و Ks10 به ترتیب برابر با $12/5 \text{ mg/ml}$ ، 50 mg/ml و 50 mg/ml برای قارچ میکروسپوروم جیستوم، MIC ایزوله های اکتینومیسیت D5، Km10، Ks8، 115، Ks1، Ks2 و Ks10 به ترتیب برابر با 100 mg/ml ، 50 mg/ml ، 25 mg/ml و 100 mg/ml برای قارچ تریکوفیتون متاگروفایتیس و MIC جدایه های اکتینومیسیت Ks2، Ks10، Ks4، Km2، Ks8، L1، Ks1 و D5 به ترتیب برابر با 25 mg/ml ، 25 mg/ml ، 25 mg/ml ، $0/39 \text{ mg/ml}$ ، 25 mg/ml و 25 mg/ml برای میکروسپوروم کانیس بود.

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 چوب پنبه سوراخ کن (کرک بردار) ایجاد گردید و از رقت های دارویی با غلظت های $100 \mu\text{g/ml}$ ، $10 \mu\text{g/ml}$ ، $1 \mu\text{g/ml}$ و $0/1 \mu\text{g/ml}$ 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 میکروسپوروم جیستوم و تریکوفیتون متاگروفایتیس انکوبه گردید (۱۲).

آزمون های زیستی تعیین فعالیت ضد قارچی جدایه های اکتینومیسیت: برای تعیین توانایی ایزوله های اکتینومیسیت در ممانعت از رشد قارچ های مذکور، از سه روش دیسک گذاری، روش کشت متقابل و روش نشن 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، ایزوله های فعال، مجدداً در محیط کشت CG مایع، تلقیح شده و فلاسک ها، در شیکر انکوباتور (120°C و دمای 28°C) قرار گرفتند. پس از سپری شدن مدت زمان اختصاصی مذکور برای هر ایزوله، محتویات هر یک از فلاسک های ارلن مایر، به طور جداگانه، توسط قیف بوخنر و یک لایه پنبه به ضخامت ۵ سانتی متر صاف شدند. مایع صاف شده، پس از منجمد شدن در فریزر -20°C توسط دستگاه فریزدرایر (دمای -40°C و فشار -2 bar) به مدت ۵ روز خشک شد. پودر به دست آمده، برای انجام مراحل بعدی، در یخچال نگهداری شد (۱۳).

تهیه حداقل غلظت بازدارنده از رشد (Minimum Inhibitory Concentration (MIC)) عصاره خام ناخالص
جدایه های اکتینومیسیت فعال: به منظور تعیین MIC در یک لوله آزمایش، ابتدا مقداری از عصاره خام ناخالص هریک از جدایه های اکتینومیسیت فعال (پودر بدست آمده در مرحله تهیه عصاره خام ناخالص) وزن شد (این مقدار وزنی را

کنند (۱۷). مشابه این پژوهش، Augustine و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه‌ای که انجام دادند، اثبات کردند که *Streptomyces rochei* AK39 (استرپتومایسس راکی AK39 دارای اثر ضد درماتوفیتی می‌باشد (۱۸). همچنین در مطالعه حاضر از بین بیش از ۱۰۰ جدایه اکتینومیسست خاکزی تعداد ۱۰ جدایه دارای ترکیبات ضد قارچی بودند که با مطالعات انجام شده در خصوص دارا بودن اثر ضد قارچی اکتینومیسست های خاکزی همخوانی دارد. فعالیت ضد قارچی این جدایه ها، مبین اهمیت و توان بالقوه آنها برای بررسی های بیشتر، پیرامون کاربرد آنها به عنوان عوامل بیوکنترل میکروسپوروم جیسئوم، میکروسپوروم کانیس و تریکوفیتون متاگروفایتیس است. هرچند باید در نظر داشت که تمامی غربالگری های 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 ضد درماتوفیتی اکتینومیسست های خاکزی بر علیه میکروسپوروم جیسئوم، میکروسپوروم کانیس و تریکوفیتون متاگروفایتیس از عوامل مسبب درماتوفیتوزیس انسانی انجام گرفته است. حداقل غلظت بازدارنده از رشد اندازه گیری شده برای متابولیت فعال ناخالص جداسازی از ایزوله های منتخب، بین ۰/۳۹-۱۰۰ mg/ml بود. طی مطالعه انجام شده توسط Zakir و همکاران (۲۰۰۲)، حداقل غلظت بازدارنده از رشد یک متابولیت فعال جداسازی شده از گونه های استرپتومایسس، علیه چهار باکتری گرم مثبت و گرم منفی، بین ۳۲-۶۴ mg/ml به دست آمد (۱۹). همچنین در بررسی که ناصر کیخا و همکاران (۲۰۱۳) بر روی تأثیر ضد قارچی اکتینومیسست های خاکزی علیه میکروسپوروم جیسئوم انجام دادند نشان دادند که حداقل غلظت بازدارنده از رشد اندازه گیری شده، برای متابولیت فعال ناخالص جداسازی از جدایه های منتخب، بین ۵۰-۱۲/۵ mg/ml بود (۲۰). از آنجایی که جدایه های بررسی شده در این تحقیق در غلظت های بسیار پایین تر نیز قادر به کنترل قارچ ها می باشند، می توان نتیجه گرفت که از نظر آنتاگونیستی، اثر بسیار خوبی در کنترل ارگانسیم های مورد مطالعه دارند. Korting و

همچنین MIC گریزئوفولون برای میکروسپوروم کانیس، میکروسپوروم جیسئوم و تریکوفیتون متاگروفایتیس به ترتیب برابر با ۱ μg/ml، ۱ μg/ml و ۱ μg/ml، MIC داروی تربینافین برای میکروسپوروم کانیس، میکروسپوروم جیسئوم و تریکوفیتون متاگروفایتیس به ترتیب برابر با ۰/۰۰۱ μg/ml، ۰/۸ μg/ml، ۰/۰۱ μg/ml، MIC داروی کتوکونازول برای میکروسپوروم کانیس، میکروسپوروم جیسئوم و تریکوفیتون متاگروفایتیس برابر با ۱ μg/ml و MIC داروی فلوکونازول برای میکروسپوروم کانیس، میکروسپوروم جیسئوم و تریکوفیتون متاگروفایتیس به ترتیب برابر با ۱۰ μg/ml، ۱۰۰ μg/ml بود. نسبت به داروی گریزئوفولون، میکروسپوروم کانیس حساس ترین و میکروسپوروم جیسئوم و تریکوفیتون متاگروفایتیس مقاومت بیشتری از خود نشان دادند. در برابر تربینافین میکروسپوروم کانیس، میکروسپوروم جیسئوم و تریکوفیتون متاگروفایتیس در محدوده غلظت های ۰/۰۰۱ μg/ml-۰/۸ μg/ml حساس بوده و رشد نکردند. نسبت به اثرات ضد قارچی داروی کتوکونازول میکروسپوروم کانیس، میکروسپوروم جیسئوم و تریکوفیتون متاگروفایتیس 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 جیسئوم و تریکوفیتون متاگروفایتیس 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 اکتینومیسست فعال با داروهای تربینافین، گریزئوفولون، کتوکونازول و فلوکونازول علیه میکروسپوروم کانیس، میکروسپوروم جیسئوم و تریکوفیتون متاگروفایتیس در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت. شهیدی و همکاران از میان ۱۳۰ جدایه اکتینومیسست توانستند ۱۲ جدایه را در غربال اولیه بر علیه *Phytophthora dreschleri* جداسازی

نسبت به گریزئوفولین حساس تر از بقیه بود. میکروسپوروم جیپسوم نسبت به فلوکونازول مقاومت بیشتری دارد. به نظر می رسد فلوکونازول دارای خوبی در درمان عفونت های ناشی از این عوامل درماتوفیتی نباشد.

نتیجه گیری

استرپتومایسس های خاکی، دارای اثرات ضد قارچی بر علیه درماتوفیت های مورد بررسی می باشند. 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 بررسی های 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 عفونت های درماتوفیتی مربوطه بهره مند شد

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر بخشی از کار پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد می باشد 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, Gottlieb D. *Importance of antibiotic production in antagonism of selected Streptomyces species*

همکاران در بررسی آزمایشگاهی حساسیت دارویی، گریزئوفولین، تربینافین، ایتراکونازول، کتوکونازول، فلوکونازول و سیکلوپیروکسامین بر علیه ۵۲ جدایه تریکوفیتون روبروم و ۴۰ جدایه تریکوفیتون متاگروفایتیس 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 گریزئوفولین و تربینافین علیه برخی از درماتوفیت های شایع انجام دادند نشان داند که حساسیت درماتوفیت ها در مقابل تربینافین به مراتب بیشتر از گریزئوفولین است که با یافته های این پژوهش همخوانی دارد (۲۲). داروی تربینافین اثر فوق العاده ای در مهار رشد میکروسپوروم جیپسوم، میکروسپوروم کانیس و تریکوفیتون متاگروفایتیس داشته و پس از آن به ترتیب گریزئوفولین، کتوکونازول و در نهایت فلوکونازول دارای اثرات مهاری کمتری بود. هر سه قارچ نسبت به کتوکونازول در غلظت های متفاوت دارای حساسیت و مقاومت یکسان بودند. میکروسپوروم کانیس

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 Toker 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. Kortting HC, Schafer-Kortting 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.

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*

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, Department 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 actinomycete, 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 Actioiomyces 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