Archive of SID

● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ چهاردهم، شمارهٔ ۳، ص ۱۶۲-۱۵۳، ۱۳۸۶

مقالهٔ پژوهشی

بررسی آزمایشگاهی اثرات ضدقارچی عصاره آبی سیر (Allium sativum) و ترکیب آن با فلوکونازول بر علیه گونه‌های کاندیدای شایع جدا شده از ضایعات کاندیدیازیس

دکتر عباسعلی‌جعفری ندوشن[1*]، مژگان دهقانی تفتی[2]، سیدمحمد میرباقری[3]

خلاصه

مقدمه: شیوع روزافزون کاندیدیازیس و به دنبال آن افزایش مصرف داروهای ضد قارچی برای درمان و پیشگیری منجر به مقاومت بعضی از گونه‌های کاندیدا نسبت به این داروها شده است. لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی برون‌تنی (*In vitro*) اثر ضد قارچی عصاره آبی سیر به تنهایی و تأثیر هم‌افزایی (Synergism) آن با فلوکونازول بر علیه گونه‌های کاندیدای شایع جدا شده از ضایعات بیماران مبتلا به کاندیدیازیس انجام شده است.

روش: اثرات ضد قارچی عصاره سیر با استفاده از روش استاندارد Broth microdilution در شرایط آزمایشگاهی (برون‌تنی) بر علیه پنج گونه کاندیداآلبیکنس، کاندیداتروپیکالیس، کاندیدا گلابراتا (تورولوپسیس گلابراتا)، کاندیداپاراپسیلوزیس و کاندیداکروزه‌ای که اغلب از ضایعات بیماران مبتلا به کاندیدیازیس جدا شده بودند و هم‌چنین سه گونه استاندارد کاندیدا بررسی شد. تأثیر هم‌افزایی عصاره سیر و فلوکونازول نیز در این مطالعه بررسی شد.

یافته‌ها: قوی‌ترین اثر عصاره سیر بر علیه کاندیداتروپیکالیس (MIC=۰/۷۸mg/ml) و سپس گونه‌های کاندیداگلابراتا (MIC=۱/۵۶mg/ml) و کاندیداآلبیکنس (MIC=۳/۱۲mg/ml) مشاهده شد که به عنوان گونه‌های حساس به عصاره سیر شناخته شدند. در حالی که گونه کاندیدا کروزه‌ای مقاوم‌ترین گونه با حداقل غلظت بازدارنده ۶/۲۵ mg/ml در مطالعه حاضر بود. هم‌چنین با ترکیب عصاره سیر و فلوکونازول حداقل غلظت مهارکننده (MIC) فلوکونازول برعلیه کاندیداتروپیکالیس ۸ مرتبه، کاندیداگلابراتا و کلاندیداآلبیکنس ۴ مرتبه و برای سایر گونه‌های مطالعه شده کاندیدا ۲ مرتبه کاهش یافت. با انجام آزمون مقایسه میانگین‌ها، تعداد کلنی‌های کاندیدای جدا شده در چاهک‌های بدون عصاره سیر در مقایسه با چاهک‌های حاوی دو غلظت عصاره سیر تفاوت معنی‌داری برای گونه‌های کاندیداتروپیکالیس (P=۰/۰۰۰۱) کاندیداگلابراتا (P=۰/۰۰۱) و کاندیداآلبیکنس (P=۰/۰۰۲) وجود داشت.

نتیجه‌گیری: گونه‌های کاندیدا خصوصاً گونه‌های مقاوم مانند کاندیداتروپیکالیس و کاندیداگلابراتا به عصاره آبی سیر حساس می‌باشند و کاربرد این عصاره همراه با فلوکونازول به صورت موضعی می‌تواند باعث افزایش اثربخشی و کاهش میزان فلوکونازول مصرفی شود.

واژه‌های کلیدی: سیر، کاندیدا، خواص ضد قارچی، برون‌تنی، هم‌افزایی، فلوکونازول

۱- استادیار گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید صدوقی یزد ۲-کارشناس آزمایشگاه، بیمارستان شهید بهشتی تفت ۳- کارشناس مرکز بهداشت تفت

* **نویسنده مسؤول، آدرس:** گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی شهید صدوقی یزد ● **آدرس پست الکترونیک :** jafariabbas@ssu.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۱۲/۱۶ **دریافت مقاله اصلاح شده :** ۱۳۸۶/۴/۶ **پذیرش مقاله:** ۱۳۸۶/۴/۲۷

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

گونه‌های کاندیدا به عنوان چهارمین عامل عفونت‌زای بیمارستانی در آمریکا گزارش شده‌اند (۲۲،۲۳). بیماری کاندیدیازیس سیستمیک در حال حاضر یکی از بیماری‌هایی است که دارای میزان مرگ و میر بالا بوده (۲۴) و هم‌چنین باعث اقامت طولانی افراد مبتلا در بیمارستان‌ها و تحمیل هزینه‌های سنگین درمان می‌شود. به علاوه ضایعات جلدی و جلدی- مخاطی این بیماری نیز دارای انتشار وسیعی در جامعه می‌باشد (۳۰).

امروزه داروهای ضد قارچ به طور روزافزون هم به عنوان عوامل پیشگیری‌کننده و هم درمان‌کننده استفاده می‌شوند (۱۱)، که این خود منجر به پیدایش گونه‌های مقاوم به دارو می‌شود. افزایش گونه‌های مقاوم به دارو و هم‌چنین مشاهده موارد متعدد شکست درمان باعث تشویق محققان به جستجوی داروهای جدید و هم‌چنین بررسی اثر ترکیب داروهای مختلف با عصاره گیاهان دارویی برای دستیابی به نتایج بهتر شده است (۹،۱۵).

امروزه موارد شکست درمان و مقاومت گونه‌های مختلف کاندیدا نسبت به ترکیبات دارویی آزولی به دنبال استفاده وسیع از این داروها در درمان ضایعات جلدی، جلدی - مخاطی و سیستمیک کاندیدایی در حال افزایش است که منجر به انتخاب و ظهور گونه‌های مقاوم در جامعه می‌شود (۱۳،۳۲). در بین داروهای آزولی، فلوکونازول داروئی با عوارض جانبی کمتر و قابلیت جذب بهتر می‌باشد. متأسفانه موارد متعددی از مقاومت نسبت به این دارو گزارش شده و انتشار و افزایش گونه‌های مقاوم به این دارو در حال گسترش می‌باشد (۲۰).

در مطالعات متعدد خواص بازدارندگی سیر بر روی رشد میکروارگانیسم‌های مختلف از جمله باکتری‌ها (۳،۱۸)، قارچ‌ها (۲،۷،۱۷،۲۵،۲۹) و ویروس‌ها (۱۴) نشان داده شده است. مطالعات چندی در ایران بر روی خواص ضد درماتوفیتی سیر انجام شده است که تأثیر این ماده را بر روی درماتوفیت‌ها (عوامل کچلی) نشان می‌دهد (۲۸) ولی در مورد خواص ضد کاندیدایی سیر به خصوص خواص ترکیبی آن با فلوکونازول مطالعه‌ای تاکنون انجام نشده است. هرچند که مکانیسم تأثیر عصارهٔ این گیاه هنوز کاملاً مشخص نیست ولی در اغلب مطالعات فعالیت ضد قارچی آن را مربوط به آلیسین و آژوئن (Ajoen) موجود در سیر می‌دانند که آلیسین می‌تواند باعث تقویت سیستم ایمنی و به خصوص افزایش قدرت بیگانه‌خواری (فاگوسیتوز) در ماکروفاژها شود (۲) و آژوئن احتمالاً باعث صدمه وتخریب دیواره سلولی کاندیدا می‌شود (۳۳). به علاوه به عقیده بعضی از محققین عصاره سیر می‌تواند ساخت پروتئین و اسیدهای نوکلئیک و لیپیدهای کاندیدا را مهار کند (۶).

هدف از انجام مطالعه حاضر ارزیابی خواص ضد قارچی عصاره سیر بر روی گونه‌های کاندیدای شایع جدا شده از ضایعات بیماران مبتلا به کاندیدیازیس و تأثیر آن بر روی افزایش خواص ضد کاندیدایی فلوکونازول در ترکیب با این دارو در آزمایشگاه بوده است.

روش بررسی

محیط کشت: ۱۰/۲ گرم محیط RPMI (سیگما) در ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل شد و سپس با افزودن ۳۴/۶ گرم اسید مرفولین پروپان سولفونیک (Sigma ,MOPS) میزانpH آن درحدود ۷ تثبیت شد. حجم نهایی محلول با آب مقطر به ۹۹۰ میلی‌لیتر رسانده و در حرارت ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. در پایان ۱۰/۲۵ میلی‌لیتر محلول استریل L-گلوتامین (سیگما) به محیط مذکور اضافه و با عبور از صافی میلیپور ۰/۲ میکرون (میلیپور – انگلیس) استریل شد. محیط فوق در حرارت ۸-۲ درجه و در محیط تاریک برای استفاده نگهداری شد (۱۱).

گونه‌های کاندیدای مورد استفاده شامل موارد زیر بودند: کاندیداآلبیکنس، کاندیداتروپیکالیس، کاندیدا گلابراتا، کاندیداپاراپسیلوزیس و کاندیداکروزه‌ای که از ضایعات کاندیدیازیس جلدی و جلدی- مخاطی (مراجعین به

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایشگاه مرکزی و آزمایشگاه قارچ شناسی پزشکی یزد) جدا شده بودند، به کمک روش‌های استاندارد آزمایشگاهی (۲۷،۳۱) با انجام کشت بر روی محیط CHROM agar (فرانسه) و Candida ID agar (۱)، تست لوله زایا، جذب و تخمیر قندها و تولید کلامیدوکونیدی روی محیط کورن میل آگار تشخیص داده و برای مطالعه در نظر گرفته شدند. لازم به ذکر است که از بعضی گونه‌های استاندارد کاندیدا مانند کاندیداآلبیکنس (ATCC 10231) و کاندیداپاراپسیلوزیس (ATCC 2201) و کاندیداکروزه‌ای (ATCC 6258) به عنوان گونه‌های کنترل در تعیین هویت گونه‌های جدا شده از بیماران استفاده شد. از هر گونه کاندیدا یک کلنی مجزا انتخاب شد و با پراکنده نمودن آن در ۵ میلی‌لیتر نرمال سالین ۰/۸۵ درصد استریل غلظت نهایی ۲×۱۰^{۳} سلول مخمر در هر میلی‌لیتر به کمک لام هموسیتومتر تهیه و برای انجام آزمایش در نظر گرفته شد.

تهیه عصاره آبی سیر: یک‌صدگرم ازخوشه‌های سیر تازه (سیر تازه اصفهان) ابتدا کاملاً با آب مقطر استریل شستشو، پوست آن جدا و به کمک دستگاه خردکن (Heidolph DIAX 600 homogenizer) کاملاً خرد شد. سپس با اضافه کردن سیر خرد شده به محیط RPMI استریل و pH برابر ۷ عصاره به غلظت نهایی ۲۵mg/ml تهیه گردید. با عبور دادن این محلول از سه لایه کاغذ صافی واتمن شماره ۱ ذرات نامحلول آن جدا و سپس با کمک صافی ۰/۲میکرون میلیپور (میلیپور- انگلیس) استریل شد. این عصاره به مدت ۱۰ هفته در حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد قابل استفاده می‌باشد (۶،۲۸). بر اساس مطالعه Adetumbi و همکاران (۶) از رقت‌های متوالی ۲۵mg/ml تا ۰/۷۸mg/ml عصاره مذکور در محیط RPMI استریل (به عنوان حلال) برای آزمایش اثربخشی دارویی در این مطالعه استفاده شد.

آزمایش حساسیت دارویی (Broth microdilution test):

در مطالعه حاضر حداقل غلظت مهارکنندگی فلوکونازول و سیر به تنهایی و ترکیب هر دو با روش استاندارد معرفی شده توسط (National Committee for Clinical laboratory Susceptibility testing) NCCLS تعیین گردید (۲۱). برای این کار در هر چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای الیزا ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف فلوکونازول (پارس دارو) پراکنده شده در، سرم فیزیولوژی ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر عصاره سیر و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۲×۱۰^{۳} CFU/ml سلول کاندیداهای مورد مطالعه اضافه شدند. با این کار حجم نهایی هر چاهک به ۲۰۰ میکرولیتر رسید که غلظت نهایی فلوکونازول از ۱۲۸µg/ml تا ۰/۵µg/ml و غلظت نهایی عصاره سیر از ۶/۲۵mg/ml تا ۰/۷۸mg/ml (با توجه به۴ برابر رقیق شدن مجدد داخل هر چاهک) و تعداد نهایی ۱۰۰۰ سلول کاندیدا در هر چاهک حاصل شد. در پایان میکروپلیت به مدت ۴۸ ساعت در حرارت $۳۵^{\circ}C$ در شیکر (۱۵۰ rpm) قرار داده شد. در نهایت غلظتی از دارو، سیر و یا ترکیب هر دو که مانع از رشد گونه‌های کاندیدا می‌شد و یا شمارش کمتر از ۵٪ تعداد سلول‌های کاندیدایی چاهک کنترل به دست می‌آمد، به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) تعیین می‌شد. لازم به ذکر است که در مورد هر غلظتی از داروی فلوکونازول، عصاره سیر و ترکیب آنها سه چاهک (سه تکرار) و برای هر کنترل ۵ تکرار انجام شد. برای کنترل بیشتر نتایج در پایان آزمایش ۱۰ میکرولیتر از ترکیب هر چاهک با ۱۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی استریل مخلوط و سپس بر روی سطح محیط کشت سابورودکستروز آگار(اکسوئید) کشت داده شد و پس از ۴۸ ساعت کلنی‌های جدا شده شمارش و نتایج حاصله به کمک تست آنالیز واریانس و با سطح اطمینان کمتر از ۰/۰۵ آنالیز آماری شد.

از سه گونه استاندارد کاندیداآلبیکنس (ATCC 10321)، کاندیداپاراپسیلوزیس (ATCC 2201) و کاندیداکروزه‌ای (ATCC 6258) به عنوان گونه‌های کنترل برای انجام آزمایش حساسیت دارویی در کنار گونه‌های مشابه جدا شده ازبیماران استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

قوی‌ترین فعالیت ضد قارچی عصاره سیر بر علیه کاندیداتروپیکالیس (MIC برابر ۰/۷۸ mg/ml) مشاهده شد کاندیدا گلابراتا (MIC برابر ۱/۵۶ mg/ml)، کاندیداآلبیکنس و کاندیداپاراپسیلوزیس (MIC برابر ۳/۱۲) به ترتیب حساسیت متوسطی به عصاره سیر نشان دادند، در حالی که کاندیداکروزه‌ای مقاوم‌ترین گونه در مطالعه حاضر بود (جدول ۱). ترکیب عصاره سیر (۳/۱۲ و ۱/۵۶ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر) با فلوکونازول باعث کاهش حداقل غلظت مهارکنندگی این دارو در مقابل تمام گونه‌های کاندیدای مورد آزمایش شد که این کاهش برای کاندیداتروپیکالیس ۸ بار، برای کاندیداگلابراتا و کاندیداآلبیکنس ۴ بار و برای سایر گونه‌های مورد مطالعه دو بار بود (جدول ۱).

با مقایسه آماری میانگین تعداد کلنی‌های جدا شده (CFU:Colony Forming Unit) در چاهک‌های بدون عصاره سیر در مقایسه با چاهک‌های دارای عصاره سیر تفاوت معنی‌داری برای گونه‌های کاندیداتروپیکالیس (P=۰/۰۰۰۱)، کاندیداگلابراتا (P=۰/۰۰۱) و کاندیداآلبیکنس (P=۰/۰۰۲) مشاهده شد. حداقل غلظت مهارکنندگی دارو و عصاره سیر و ترکیب آنها، با کشت ۱۰ میکرولیتر از محلول هر چاهک و شمارش کلنی‌های جدا شده، کنترل شد که نتایج آن در جدول ۲تا ۶ آمده است. علاوه بر۵ گونه شایع ذکر شده، با توجه به جداسازی یک مورد کاندیدا دابلی‌ینسیس از ضایعات یک بیمار مبتلا به کاندیدیازیس دهانی که در شهر یزد برای اولین بار گزارش شد (۱) حساسیت این گونه به عصاره سیر نیز بررسی شد که حساسیتی بیشتر از کاندیداآلبیکنس (MIC<۳/۱۲mg/ml) و کمتر از کاندیداتروپیکالیس در مقابل عصاره سیر نشان داد. لازم به ذکر است که نتایج میزان حساسیت دارویی گونه‌های استاندارد با گونه‌های مشابه جدا شده از بیماران مشابه بود و به همین دلیل صرفاً نتایج گونه‌های گرفته شده از بیماران در این مطالعه ذکر شده است.

جداول شماره ۲تا ۶ مقادیر MIC فلوکونازول را با توجه به کشت محصول آزمایش حساسیت دارویی در غلظت‌های کمتر یا بیشتر از MIC نشان می‌دهد. مقادیر MIC در حقیقت تعداد سلول‌های مخمری است که تقریباً معادل تعداد اولیه سلول‌های مخمری وارد شده در چاهک‌ها است. مقادیر شمارش مشخصه MIC به صورت زیر خطدار نمایش داده شده است.

جدول۱ : *میزان حساسیت گونه‌های کاندیدا مورد آزمایش به عصاره سیر و فلوکونازول به تنهایی و ترکیب با یکدیگر*

MIC / گونه‌های کاندیدا	سیر (mg/ml)	فلوکونازول (µg/ml)	فلوکونازول و سیر (۳/۱۲µg/ml)	فلوکونازول و سیر (۱/۵۶µg/ml)
کاندیداآلبیکنس	۳/۱۲	۲	۰/۵	۱
کاندیداتروپیکالیس	۰/۷۸	۶۴	۴	۸
کاندیداگلابراتا	۱/۵۶	۳۲	۸	>۸
کاندیداپاراپسیلوزیس	۳/۱۲	۴	۲	۲
کاندیداکروزه‌ای	۶/۲۵	>۶۴	۳۲	۶۴

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲ : *شمارش کلنی (CFU/ml) گونه کاندیدا آلبیکنس در برابر فلوکونازول به تنهایی و ترکیب با دو غلظت از عصاره سیر*

شرایط آزمایش	فلوکونازول ۴µg/ml	فلوکونازول ۲µg/ml	فلوکونازول ۱µg/ml	فلوکونازول ۰/۵µg/ml
بدون عصاره سیر	$<۱/۱\times۱۰^{۲}$	۱×۱۰^{۳}	$۳/۷\times۱۰^{۴}$	$۵/۳\times۱۰^{۷}$
با عصاره سیر (۳/۱۲۵mg/ml)	۰	۰	$<۱/۲\times۱۰^{۲}$	$۱/۲\times۱۰^{۳}$
با عصاره سیر (۱/۵۶mg/ml)	۰	$<۱/۲\times۱۰^{۲}$	۱×۱۰^{۳}	$۱/۱\times۱۰^{۴}$

جدول ۳ : *شمارش کلنی (CFU/ml) گونه کاندیدا تروپیکالیس در برابر فلوکونازول به تنهایی و ترکیب با دو غلظت از عصاره سیر*

شرایط آزمایش	فلوکونازول ۶۴µg/ml	فلوکونازول ۳۲µg/ml	فلوکونازول ۱۶µg/ml	فلوکونازول ۸µg/ml	فلوکونازول ۴µg/ml
بدون عصاره سیر	$۱/۱\times۱۰^{۳}$	$۲/۱\times۱۰^{۴}$	$۵/۱\times۱۰^{۵}$	$۳/۲\times۱۰^{۶}$	۱×۱۰^{۷}
با عصاره سیر (۳/۱۲۵mg/ml)	۰	۰	۰	۱×۱۰^{۲}	$۱/۱\times۱۰^{۳}$
با عصاره سیر (۱/۵۶mg/ml)	۰	۰	$۱/۵\times۱۰^{۲}$	$۱/۳\times۱۰^{۳}$	$۲/۴\times۱۰^{۶}$

جدول ۴ : *شمارش کلنی (CFU/ml) گونه کاندیدا گلابراتا در برابر فلوکونازول به تنهایی و ترکیب با دو غلظت از عصاره سیر*

شرایط آزمایش	فلوکونازول ۶۴µg/ml	فلوکونازول ۳۲µg/ml	فلوکونازول ۱۶µg/ml	فلوکونازول ۸µg/ml	فلوکونازول ۴µg/ml
بدون عصاره سیر	۰	$۱/۴\times۱۰^{۳}$	$۷/۱\times۱۰^{۳}$	$۲/۵\times۱۰^{۴}$	$۱/۷\times۱۰^{۶}$
با عصاره سیر (۳/۱۲۵mg/ml)	۰	۰	$<۱\times۱۰^{۲}$	$۱/۱\times۱۰^{۳}$	$۲/۵\times۱۰^{۴}$
با عصاره سیر (۱/۵۶mg/ml)	۰	۰	۰	$۱/۳\times۱۰^{۲*}$	$۲/۹\times۱۰^{۴}$

* مقدار MICفلوکونازول در ترکیب باغلظت ۱/۵۶ µg/ml سیر بیشتر از ۴ و کمتر از ۸بوده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵ :شمارش کلنی(CFU/ml) گونه کاندیداپاراپسیلوزیس در برابر فلوکونازول به تنهایی و ترکیب با دو غلظت از عصاره سیر

شرایط آزمایش	فلوکونازول ۸µg/ml	فلوکونازول ۴µg/ml	فلوکونازول ۲µg/ml	فلوکونازول ۱µg/ml	فلوکونازول ۰/۵µg/ml
بدون عصاره سیر	$<1\times10^{2}$	$1/3\times10^{3}$	$2/4\times10^{4}$	$3/4\times10^{5}$	$4/5\times10^{6}$
با عصاره سیر (۳/۱۲۵mg/ml)	۰	$<1\times10^{2}$	$1/2\times10^{3}$	$3/1\times10^{4}$	$5/2\times10^{5}$
با عصاره سیر (۱/۵۶mg/ml)	۰	۰	1×10^{3}	$4/2\times10^{4}$	$7/2\times10^{5}$

جدول ۶ :شمارش کلنی(CFU/ml) گونه کاندیدکروزه‌ای در برابر فلوکونازول به تنهایی و ترکیب با دو غلظت از عصاره سیر

شرایط آزمایش	فلوکونازول ۱۲۸µg/ml	فلوکونازول ۶۴µg/ml	فلوکونازول ۳۲µg/ml	فلوکونازول ۱۶µg/ml	فلوکونازول ۸µg/ml
بدون عصاره سیر	$1/6\times10^{2}$*	$1/6\times10^{3}$	1×10^{4}	$2/6\times10^{5}$	$4/6\times10^{6}$
با عصاره سیر (۳/۱۲۵mg/ml)	۰	$1/3\times10^{2}$	1×10^{3}	$1/1\times10^{4}$	$2/6\times10^{5}$
با عصاره سیر (۱/۵۶mg/ml)	$2/1\times10^{2}$	$1/3\times10^{3}$	$1/2\times10^{4}$	$3/2\times10^{5}$	1×10^{6}

* مقدار MIC عصاره سیر بیشتر از ۶۴ و کمتر از ۱۲۸ بوده است.

بحث

انتشار قارچ‌های مقاوم به داروهای ضد قارچی و شکست‌های درمانی در درمان بعضی از بیماری‌های قارچی ضرورت جستجو برای انواع جدید داروهای ضد قارچی و ترکیباتی که بتوانند باعث مهار و کنترل مکانیسم‌های مقاومت در قارچ‌ها شوند را توجیه می‌کند. این مهم منجر به تحقیق در مورد داروهای جدید به ویژه بر روی گیاهان دارویی و ترکیبات گرفته شده از آنها برای پی بردن به خواص ضد قارچی آنها به تنهایی و یا ترکیب با داروهای شیمیایی شده است. در بین منابع طبیعی برخی مواد با فعالیت ضد قارچی بر علیه گونه‌های مختلف قارچی پیدا می‌شود که در این میان سیر از اهمیت به سزایی برخوردار است (۷).

نیاز به داروها و ترکیبات ضد قارچی جدید زمینه انجام تحقیق حاضر برای بررسی آزمایشگاهی خواص ضد کاندیدایی عصاره سیر به تنهایی و همراه با فلوکونازول بوده است. مطالعات متعددی فعالیت مهارکنندگی رشد عصاره سیر بر روی قارچ‌های مختلف از جمله درماتوفیت‌ها (۱۷،۲۶،۲۸) و مخمرها (۱۰،۲۹) را نشان داده است. آزول‌ها اخیرا به عنوان وسیع‌ترین داروی ضد قارچی مورد استفاده

www.SID.ir

Archive of SID

برای درمان بیماری‌های قارچی محسوب می‌شوند که به دلیل عوارض جانبی کمتر و در دسترس بودن از آنها استقبال شده است. فلوکونازول داروی انتخابی برای درمان ضایعات کاندیدیازیس و ضایعات قارچی فرصت طلب در افراد مبتلا به ایدز محسوب شده و با توجه به کم بودن عوارض جانبی آن کاربرد زیادی دارد (۸). در حالی که مطالعات و گزارش‌های متعدد مقاومت گونه‌های مختلف کاندیدا نسبت به این دارو را نشان می‌دهد و به نظر می‌رسد که ترکیب این دارو با مواد دیگری که خاصیت ضد قارچی داشته باشد می‌تواند باعث افزایش تأثیر آن بر روی گونه‌های کاندیدا باشد. هر چند تأثیر ضد قارچی عصاره سیر بر روی باکتری‌ها و قارچ‌های مختلف مطالعه شده ولی تاکنون تأثیر ترکیب عصاره سیر با فلوکونازول بر علیه گونه‌های کاندیدای جدا شده از بیماران بررسی نشده است.

در مطالعه حاضر از روش مینیاتوری NCCLS (۲۱)و از گونه‌های کاندیدایی که از نمونه‌های بالینی بیماران مبتلا به کاندیدیازیس جدا شده و تعیین گونه شده بودند (۱)، برای انجام تست‌های حساسیت دارویی با رعایت تمام استانداردهای تست مذکور استفاده شد. این روش از روش‌های معتبری است که امروزه به این منظور استفاده می‌شود (۱۱،۲۱). با توجه به این که عصاره تازه سیر تأثیر مفیدتر و بهتری بر روی مهار رشد کاندیدا دارد (۱۹) در این مطالعه از عصاره تازه سیر استفاده شد.

با توجه به این که کاندیداتروپیکالیس مقاوم به آمفوتریسین B (۱۲) و کاندیداگلابراتا از گونه‌های مقاوم به فلوکونازول به شمار می‌رود (۱۶)، حساسیت این دو گونه در مقابل عصاره سیر در مطالعه حاضر قابل اهمیت است به طوری که ترکیب این عصاره با فلوکونازول باعث کاهش حداقل غلظت مهار کننده فلوکونازول به میزان هشت بار بر علیه کاندیداتروپیکالیس و چهار بار در مقابل کاندیداگلابراتا شد. علاوه بر این، کاندیداآلبیکنس که از شایع‌ترین عوامل ایجاد کاندیدیازیس می‌باشد نیز حساسیت متوسطی نسبت به عصاره سیر نشان داد. کردی و همکاران (۴) در مطالعه‌ای که بر روی اثر دوش مهبلی عصاره سیر و کرم مهبلی کلوتریمازول در زنان مبتلا به کاندیدیازیس واژن انجام دادند درمان موفقیت‌آمیز (۳۴/۷ درصد) آنها را به وسیله دوش مهبلی عصاره سیر گزارش کردند. آنها هم‌چنین گونه‌های کاندیداآلبیکنس و کاندیداتروپیکالیس را حساس‌ترین گونه‌ها ولی گونه کاندیداکروزه‌ای مقاوم به سیر گزارش کردند که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. علاوه بر کاندیدا، تأثیر مهاری سیر بر روی درماتوفیت‌های مختلف مانند میکروسپوروم کانیس، اپیدرموفیتون فلوکوزوم، تریکوفیتون تونسورانس، تریکوفیتون روبروم و میکروسپوروم جیپسیوم نیز گزارش شده است (۵).

نتیجه‌گیری

گونه‌های کاندیدا خصوصاً گونه‌های مقاوم به داروهای معمول مانند کاندیداتروپیکالیس، کاندیداگلابراتا و کاندیداآلبیکنس در این مطالعه و در شرایط آزمایشگاه نسبت به عصاره آبی سیر حساس بودند. با این حال مطالعات آزمایشگاهی بیشتر و مطالعه بر روی حیوانات حساس آزمایشگاهی لازم است تا در شرایط برون‌تنی (*In vitro*) و درون تنی (*In vivo*) میزان حساسیت این قارچ‌ها نیز بررسی شوند.

www.SID.ir

Archive of SID

Summary

In vitro Antifungal Effect of Aqueous Garlic (*Allium Sativum*) Extract and its Combination with Fluconazole Against Five Common Clinical *Candida* Isolated from Candidiasis Lesions

Jafari Nodoushan A.A., Ph.D.[1], Dehghani M., B.S.c.[2], Mirbagheri SM., B.S.c.[3]

1. Assistant Professor of Parasitology and Mycology Dep., Medical School, Shahid Sadoughi (Yazd) University of Medical Sciences and Health Services, Yazd, Iran 2. Laboratory expert, Shahid Beheshti Hospital, Shahid Sadoughi (Yazd) Univesity of Medical Sciences and Health Services, Taft, Yazd, Iran 3. Expert, Taft Health Centre, Shahid Sadoughi (Yazd) University of Medical Sciences and Health Services, Taft, Yazd, Iran.

Introduction: Increasing rate of candidiasis prevalence and consequently use of antifungal drugs as prophylactic and curative agents has led to the widespread emergence of resistant strains. Therefore this study was designed to evaluate the *in vitro* antifungal activity of an aqueous extract of garlic and the synergic effect of garlic extract with fluconazole against common clinical isolates of *Candida* species from patients with candidiasis.

Methods: The antifungal activity of aqueous garlic extract was investigated in an *in vitro* system using standard broth microdilution method against five common clinically isolates of *Candida* species including *C. albicans, C. tropicalis, C. glabrata (T.glabrata), C. parapsilosis, C. krusei* and 3 standard strains of *Candida*. The synergic antifungal effect of garlic extract in combination with fluconazole was also determined.

Results: The strongest activity of garlic extract was seen against *Candida tropicalis* (MIC=0.78mg/ml), *C. glabrata (MIC=1.56mg/ml)*, and *C. albicans (MIC=3.12mg/ml) respectively*. *C. krusei* was the most resistant species against garlic extract (MIC 6.25mg/ml). The minimum inhibition concentration of fluconazole was reduced eight folds against *C. tropicalis*, 4 folds against *C. albicans* and *C. glabrata*, and 2 folds for other *Candida* species in the presence of 3.12 mg/ml garlic extract. In comparing means, the isolated colonies (CFU) in wells without garlic extract and CFU in other wells showed statistical significant differences for *C. tropicals* (P=0.0001), *C. glabrata* (P=0.001) and *C. albicans* (P=0.002).

Conclusion: *Candida* species particularly resistant species such as *Candida tropicalis* and *Candida glabrata* are sensitive to aqueous extract of garlic, and combination of garlic extract with fluconazole in topical use could increase the efficacy rate of fluconazole.

Key words: *Allium sativum*, *Candida*, Antifungal, *in vitro*, Synergism, Floconazole

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2007; 14(3): 153-162

منابع

۱. جعفری، عباسعلی؛ انوری، محمد حسین و غفورزاده، مهین. تعیین هویت گونه‌های کاندیدا جدا شده از ضایعات ۱۵۰بیماران مبتلا به کاندیدیازیس با استفاده از محیط کشت Candida ID agar و Candida CHROM agar. مجله پزشکی کوثر. دوره ۱۱، شماره ۴، ص ۳۰-۳۲۵.

۲. سلطانی، مریم؛ یادگاری، محمد حسین و صراف، محمد حسن: بررسی تأثیر آلیسین سیر بر فعالیت ماکروفاژها در بلع کاندیداآلبیکنس (شرایط *in vitro*). مجله دانشکده پزشکی اصفهان، تابستان ۱۳۸٤، سال ۲۳، شماره ۲۷، ص ٥٤-٤۹.

۳. شاپوری، رضا؛ ستاری، مرتضی و زهیر، محمد حسن. اثر ضد میکروبی عصاره کلروفرمی سیر (آلیسین) بر بروسلاملی‌تنسیس (Rev1) و بروسلاآبورتوس (S19) درون ماکرو فاژ. یاخته، تابستان ۱۳۸۳، سال ششم، شماره ۲۲، ص ٤-۸۱

www.SID.ir

Archive of SID

٤. کردی، معصومه؛ جهانگیری، نادیا؛ رخشنده، حسن و غلامی، حسن. مقایسه اثر دوش مهبلی عصاره سیر و کرم مهبلی کلوتریمازول در درمان زنان مبتلا به کاندیدیازیس واژن. مجله زنان و نازایی ایران، پاییز و زمستان ۱۳۸۳، سال ۸ شماره ۲، ص ۴۲-۲۳.

٥. لاری‌پور، محدثه؛ یادگاری، محمدحسین؛ حسن زهیرمحمد و اخوان‌سپهی، عباس. اثر سیر در جلوگیری از رشد درماتوفیت‌ها در شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی. یاخته، ۱۳۸۵؛ سال ۸ شماره ۷، ص ۱٦-۲۹.

6. Adetumbi M, Javor GT, Lau BH. Allium sativum (Garlic) Inhibits Lipid Synthesis by Candida albicans. *Antimicrob Ageents Chemother* 1986; 30(3): 491-503.
7. Auger J, Arnault I, Diwo-Allain S, Ravier M, Molia F, Magali P. Insecticidal and fungicidal potential of Allium substances as biofumigants. *Agroindustria* 2004; 3(3): 5-8.
8. Barchiesi F, Najvar LK, Luther MF, Scalise G, Rinaldi MG, Graybill JR. Variation in fluconazole efficacy for Candida albicans strains sequentially isolated from oral cavities of patients with AIDS in an experimental murine candidiasis model. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40(5): 1317-20.
9. Boken DJ, Swindells S, Rinaldi MG. Fluconazole-resistant candida albicans. *Clin Infect Dis* 1993; 17(6): 1018-21.
10. Conner D.E, Beuchat LR. Sensitivity of Heat-Stressed Yeasts to essential oils of plants. *Appl Environ Microbiol* 1984; 47(2): 229-33.
11. Cormican MG, Pfaller MA. Standardization of antifungal susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* 1996; 38(4): 561-78.
12. De Marie S. New developments in the diagnosis and management of invasive fungal infections. *Haematologiac* 2000; 85(1): 88-93.
13. Denning DW. Can we prevent azole resistance in fungi? *Lancet* 1995; 346(8973): 454-5.
14. Esanu V, Prahoveanu E. The effect of garlic extract, applied as such or in association with NaF, on experimental influenza in mice. *Virologie* 1983; 34(1): 11-7.
15. Glatt AE, Chirgwin K, Landesman SH. Current concepts. Treatment of infections associated with human immunodeficiency virus. *N Eng J Med* 1998; 318(22): 1439-48.
16. Hitchcock CA, Pye GW, Troke PE, Johnson EM,Warnock DW. Fluconazole Resistance in Candida glabrata. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37(9): 1962-5.
17. Karunyal SA, Andrews B, Jebashree H. *In vitro* evaluation of the antifungal activity of Allium sativum bulb extract against Trichophyton rubrum, a human skin pathogen. *World J Microbiol Biotechnol* 2000; 16(7): 617-20.
18. Kudi A.A, Ngbede JE. *In vitro* antibacterial activity of aqueous garlic (Allium sativum Linn.) extract on isolates from surface wounds. *J Food Agricu Environ* 2006; 4(3&4): 15-16.
19. Lemar KM, Turner MP, Lioyd D. Garlic (Allium sativum) as an anti-Candida agent: a comparison of the efficacy of fresh garlic and freeze-dried extracts. *J Appl Microbiol* 2002, 93(3): 398–405
20. Messer SA, Diekema DJ, Boyken L, Tendolkar S, Hollis RJ, Pfaller MA. Activities of Micafungin against 315 Invasive Clinical Isolates of Fluconazole-Resistant *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 2006; 44(2): 324-6.
21. National Committee for Clinical Laboratory Standards (1994): Development of *in vitro* susceptibility testing criteria and quality control parcemeters. approved guidelines M23-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, villanova, PA.
22. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Hollis RG, Messer SA. International surveillance of bloodstream infections due to Candida species: frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY program. *J Clin Microbiol* 1998; 36(7): 1886–9.
23. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Messer SA, Houston A, et al. Bloodstream

www.SID.ir

Archive of SID

infections due to Candida species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997–1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(3): 747–51.

24. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Further standardization of broth microdilution methodology for *in vitro* susceptibility testing of caspofungin against candida species by use of an international collection of more than 3,000 clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2004; 42(7): 3117–9.
25. Prasad G, Sharma VD. Antifungal property of garlic (Allium sativum Linn.) in poultry feed substrate. *Poult Sci* 1975; 60:541-5.
26. Prasad G, Sharma VD, Kumar A. Efficacy of garlic (allium sativum L.) therapy against experimental dermatophytosis in rabbits. *Indian J Med Res* 1982; 75: 465-7.
27. Sandven P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. *Acta Odontol Scand* 1990; 48(1): 27-36.
28. Shams Ghahfarokhi M, Razafsha M, Allameh A and Razzaghi Abyaneh M. Inhibitory Effects of Aqueous Onion and Garlic Extracts on Growth and Keratinase Activity in Trichophyton mentagrophytes. Iran. *Biomed J* 2003; 7 (3): 113-118
29. Shuford JA, Steckelberg JM, Patel R. Effects of Fresh Garlic Extract on Candida albicans Biofilms. Antimicrob *Agents Chemother* 2005; 49(1): 4-73.
30. Takakura S, Fujihara N, Saito T, Kudo T, Iinuma Y, Ichiyama S. National surveillance of species distribution in blood isolates of Candida species in Japan and their susceptibility to six antifungal agents including voriconazole and micafungin. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53(2): 283–9.
31. Terai H, Shimahara M. Atrophic tongue associated with Candida. *J Oral Pathol Med* 2005; 34(7): 397–400.
32. Warnock D. W. Azole drug resistance in Candida species. *J Med Microbiol* 1992; 37(4): 225-6.
33. Yoshida S, Kasuga S, Hayashi N, Ushiroguchi T, Matsuura H, Nakagawa S. Antifungal Activity of ajoene derived from garlic. *Appl Environ Microbiol* 1987; 53(3): 615-7.

www.SID.ir