Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 9, Number 3 (08-2015)

Journal homepage: www.ijmm.ir

In vitro comparison of antifungal effect of silver nanoparticle on *Candida* producer of vulvovaginal candidiasis

Afsaneh Asghari [1], Nooshin Naghsh[2], Mahboobeh Madani[1]

1. Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
2. Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2014/04/19
Accepted: 2015/01/01
Available online:2015/11/30

Article Subject:
Antimocrobial Substance

IJMM 1394; 9(3): 23-30

Corresponding author at:

Dr. Nooshin Naghsh

Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

Email:
n_naghsh@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: Recently opportunistic fungus resistance has significantly increased like *Candida albicans*. The poison in antibacterial drugs, resistance in fungus and existence of different drugs make it necessary to use more effective drugs with a higher level of influence and less poison. also large number of investigations showed biologic influence of silver nanoparticles.The aim this study was In vitro comparison of antifungal effect of silver nanoparticle on *Candida* producer of vulvovaginal candidiasis.

Materials and Methods: In order to identification of samples was used from conventional mycological methods: morphology on corn meal agar and chrom agar and germ tube production. To evaluate the antifungal effect of spherical silver nanoparticles with 10 nm diameter on the isolates. Inhibitory zone diameter after 24-48 hour were performed by disk diffusion method. Also inhibitory effect of nanoparticles in all the samples were compared with fluconazol. Also MIC and MFC of samples were determined by microdilution method.

Results: Total of isolates of *C. albicans* (50 sampels), 36 samples were inhibited with spherical silver nanoparticles with 10 nm diameter. Inhibitory zone diameter was between 0-15 mm. MIC was between 31.25-125 ppm and MFC was between 62.5-250 ppm.

Conclusions: The results of the present investigation showed that spherical silver nanoparticles with 10 nm diameter has some antifungal effect against *Candida albicans*. Probably in the future after looking at this silver nanoparticles can be used in the treatment of producer of vulvovaginal candidiasis.

Key Words: Silver nanoparticles, *Candida albicans*, candidiasis, anti-fungal activity

Copyright © 2015 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Asghari A, Naghsh N, Madani M. In vitro Comparison of antifungal effect of silver nanoparticle on Candida producer of vulvovaginal candidiasis. Iran J Med Microbiol. 2015; 9 (3) :23-30

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۹ – شماره ۳ – پاییز ۱۳۹۴

Journal homepage: www.ijmm.ir

بررسی اثر ضد قارچی نانو ذرات نقره بر روی عوامل مولد ولوواژینیت کاندیدایی در شرایط آزمایشگاهی

افسانه اصغری[۱]، نوشین نقش[۲]، محبوبه مدنی[۱]

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
۲. گروه زیست شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۳/۰۱/۳۰

پذیرش:۱۳۹۳/۱۰/۱۰

انتشار آنلاین:۱۳۹۴/۰۹/۰۹

موضوع:

مواد ضد میکروبی

IJMM 1394; 9(3): 23-30

نویسنده مسئول:

دکتر نوشین نقش

گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران

تلفن: ۰۳۱۱۷۴۲۰۱۳۶

پست الکترونیک:

n_naghsh@yahoo.com

چکیده

زمینه و اهداف: در سالهای اخیر مقاومت سوش های قارچی فرصت طلب از جمله *کاندیدا آلبیکنس* به میزان زیادی افزایش یافته است. سمیت داروهای ضد میکروبی، ایجاد مقاومت در قارچ ها و تداخل های دارویی توجه به بررسی ترکیبات دارویی جدید را خاطر نشان می سازد. همچنین مطالعات گسترده ای اثرات بیولوژیکی نانو ذرات نقره را نشان می دهند. هدف از این تحقیق بررسی اثر ضد قارچی نانو ذرات نقره بر روی عوامل مولد ولوواژینیت کاندیدایی در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش کار: به منظور تشخیص نمونه ها از روش های معمول قارچ شناسی شامل: شکل ظاهری بر محیط کورن میل آگار، کروم آگار و ایجاد لوله زایا استفاده گردید. جهت بررسی اثرات ضد قارچی نانوذرات نقره کروی شکل با قطر ۱۰ نانو متر بر روی ایزوله ها، قطر هاله ممانعت از رشد پس از ۴۸-۲۴ ساعت با استفاده از روش انتشار دیسک اندازه گیری شد. میزان MIC و MFC ایزوله ها با استفاده از روش میکرودایلوشن تعیین شد.

یافته‌ها: از مجموع ایزوله های *کاندیدا آلبیکنس* شناسایی شده (۵۰ نمونه)، تعداد ۳۶ نمونه توسط نانو ذرات نقره کروی با قطر ۱۰ نانو متر مهار شدند. قطر هاله ممانعت از رشد بین ۱۵-۰ میلی متر به دست آمد. *MIC* نمونه ها بین *ppm* ۱۲۵– ۲۵/۳۱ و *MFC* نمونه ها بین *ppm* ۶۲/۵ - ۲۵۰ بود.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از بررسی حاضر نشان دادند که نانو ذرات نقره کروی با قطر ۱۰ نانو متر تا حدودی دارای فعالیت ضد قارچی علیه *کاندیدا آلبیکنس* می باشند. احتمال دارد در آینده پس از بررسی این نانوذرات بتوان در درمان عوامل مولد ولوواژینیت کاندیدایی از آنها استفاده نمود.

کلمات کلیدی: نانو ذرات نقره، *کاندیدا آلبیکنس*، کاندیدیاز ، اثر ضد قارچی

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

در طی دهه‌های اخیر مطالعات زیادی بر روی میکروارگانیسم‌های فرصت طلب انجام شده است که عمدتاً به علت افزایش مرگ و میر زیاد بر اثر این میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. مخمر کاندیدا شایعترین قارچ فرصت طلب می باشد (۱، ۲). کاندیدیازیس به گروهی از بیماری‌ها اطلاق می‌شود که توسط گونه‌های مختلف کاندیدا ایجاد می‌شود. این عوامل قارچی باعث ایجاد بیماری در انسان و حیوانات می‌گردند. گونه های مختلف کاندیدا به صورت همزیست در قسمت هایی مثل پوست و مجاری مخاطی بدن وجود داشته و در شرایطی که مقاومت میزبان به صورت موضعی و یا سیستمیک دچار اختلال گردد به صورت پاتوژن عمل می کنند (۳). واضح است که تغییرات فلور طبیعی روده دراثر درمان با آنتی‌بیوتیک بر تعداد کلنی *کاندیدا آلبیکنس* در روده تغییراتی وارد می‌سازد. در واقع با ازبین رفتن لاکتوباسیل‌ها در اثر آنتی بیوتیک و کم شدن اسید لاکتیک در محیط، افزایش رشد و تکثیر در کاندیدا

مشهود است. اتصال گونه‌ای کاندیدا به بسیاری از بافت ها و سطوح بی جان برای مراحل اولیه ی کلونیزاسیون و تهاجم بافتی ضروری است. *کاندیدا آلبیکنس* محکم تر از دیگر کاندیداها به سلول‌های اپی تلیال متصل می شود. اتصال کاندیدایی توسط سازوکارهای اختصاصی و غیر اختصاصی انجام می شود. سلول های جوان *کاندیدا آلبیکنس* راحت‌تر از سلولها ی مسن به بافت میزبان متصل می‌شوند. آب گریزی سطح سلولی *کاندیدا آلبیکنس* نقش مهمی در اتصال ارگانیسم به سلول های یوکاریوتی بازی می کند (۴، ۵). در سال‌های اخیر گزارش های متعددی از شکست در درمان مبتلایان به اشکال بالینی متفاوت کاندیدیازیس ارایه شده است. داروهای ضدقارچی با فرمولاسیون‌های متفاوت جهت درمان وجود دارد که در بسیاری از موارد به دلیل عدم پاسخ مناسب به درمان، بیماری به شکل مزمن در آمده و گاهی عودهای مکرر مشاهده می شود. همچنین به دلیل مقاومت دارویی گونه های کاندیدا و نیاز به مصرف طولانی مدت داروهای ضد قارچی که خود سبب بروز عوارض جانبی ناشی از مصرف آن ها می گردد، محدودیت هایی را در استفاده از این قبیل ترکیبات ضد قارچی پدید آورده است (۸-۶). حال این پرسش برای ما مطرح می‌شود که چرا در سال‌های اخیر تحقیقات بر روی ترکیبات نانو برای مهار این میکروارگانیسم-ها زیاد شده است. امروزه به کمک علم پزشکی هر روز به تعداد بیماری‌های قابل درمان افزوده می‌شود. نانوتکنولوژی یکی از شیوه-های جدید و تخصصی درمان بیماری ها می‌باشد. محققان نانوتکنولوژی با ابعاد وسیعی از کاربردهای نانو ذرات آشنا شده اند که ممکن است نقش بسیار زیادی در پزشکی، پیشگیری و درمان بیماری ها و تولید دارو داشته باشد(۱۱-۹). از آنجایی که برخی داروهای رایج ضدقارچی دارای عوارض جانبی متعدد از جمله سرطان و مسمومیت هستند و همچنین مقاومت دارویی در مصرف آن ها ایجاد می شود و از طرفی تأثیرات نانو ذرات نقره کروی با قطر ۱۰nm تابه حال برای این نوع قارچ بررسی نشده است، لذا این تحقیق به منظور بررسی اثر ضد قارچی نانو ذرات نقره بر روی کاندیداهای مولد ولوواژینیت کاندیدایی در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم های مورد بررسی از گونه *کاندیدا آلبیکنس* انتخاب شدند. نمونه استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* (ATCC-1677) از انستیتو پاستور تهران و نمونه های کلینیکی این میکروارگانیسم‌ها از نمونه های ارجاعی به بیمارستان غرضی در شهر اصفهان فراهم گردیدند. نمونه گیری از بیماران به صورت تست پاپ اسمیر و کشت نمونه های واژن بر روی محیط سابارو دکستروز آگار انجام گرفت.

مراحل تشخیص گونه های کاندیدا

به این منظور ابتدا در شرایط کاملا استریل از نمونه های قارچی مورد نظر بر پلیت حاوی محیط کشت سابارو دکستروز آگار (مرک-آلمان) کشت تازه تهیه شد و در انکوباتور ۳۵ درجه سلسیوس قرار داده شد.

تهیه لام مستقیم

یک کلنی خالص از قارچ مربوطه انتخاب و به کمک رنگ آمیزی لام مستقیم زیر میکروسکوپ مشاهده گردید.

پدیده ایجاد لوله زایا (Reynolds Braunde)

برای تشخیص گونه *کاندیدا آلبیکنس* پدیده ایجاد لوله زایا بررسی شد. به این منظور یک کلنی از قارچ با یک سی سی سرم انسانی مخلوط شد و ۳-۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از گذشت زمان ۳-۴ ساعت مقداری از سوسپانسیون را بین لام و لامل قرار داده و زیر میکروسکوپ ایجاد لوله زایا بررسی شد. *کاندیدا آلبیکنس* در این محیط لوله زایا ایجاد می کند که طول آن ۲/۵ برابر قطر سلول مادر است. در حالی که سایر گونه های کاندیدا لوله زایا ایجاد نمی کنند و یا لوله زایا کوتاه است. آزمون فوق برای تأیید نتایج بعد از ۲۴ ساعت نیز ۳ بار تکرار شد (۶).

ایجاد کلامیدوکونیدی در محیط کورن میل آگار

به منظور تشخیص کلامیدوکنیدی از محیط کورن میل آگار (بیومارک-هند) حاوی توئین ۸۰ (مرک- آلمان) استفاده شد. قسمتی از کلنی توسط یک میله پلاتین سر کج به صورت یک خط افقی در محیط کشت تلقیح شد و یک لامل در محیط کشت قرار داده شد. پلیت ها به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. بعد از گذشت زمان، محل تلقیح زیر میکروسکوپ بررسی شد (۶).

کشت در محیط کروم کاندیدا آگار

به منظور تشخیص گونه های کاندیدا، کشت در محیط کروم آگار کاندیدا (پاریس) انجام شد. یک کلنی از کشت تازه کاندیدا بر روی محیط کروم آگار کاندیدا به صورت خطی کشت داده شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. بعد از مدت زمان ۴۸ تا ۷۲ ساعت رنگ ایجاد شده کلنی روی محیط کشت بررسی شد. کلنی سبز روشن نشانگر *کاندیدا آلبیکنس* است (۶).

تهیه نمونه از استوک اصلی

از کلیه ی نمونه های *کاندیدا آلبیکنس* جهت انجام انواع تست های تعیین حساسیت *کاندیدا آلبیکنس* به نانو ذرات نقره استفاده شد. بدین منظور ابتدا در شرایط کاملا استریل از قارچ مورد نظر بر پلیت حاوی سابورو دکستروز آگار کشت تازه ۲۴ ساعته تهیه شد. سپس یک کلنی خالص از قارچ مربوطه انتخاب و در یک سی سی سرم فیزیولوژی استریل، سوسپانسیون قارچی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه گردید.

تهیه غلظت های مختلف از نانو ذرات نقره

در این بررسی از نانو ذرات نقره کروی شکل با قطر ۱۰ نانومتر و فرمول شیمیایی Ag که توسط شرکت سیگما طراحی و سنتز شده بود استفاده شد. این نانو ذرات به صورت محلول کلوییدی یکنواخت قهوه ای رنگ با غلظت ppm ۱۰۰۰ و در فاز آناتاز تهیه شد. استوک اصلی نانو ذرات نقره به صورت محلول و با غلظت ۱۰۰۰ppm بود.. جدول شماره ی ۲، اطلاعات مربوط به نانوذرات نقره مورد استفاده را نشان می دهد. غلظت های مختلف از نانو ذرات نقره(۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ppm) با استفاده از حلال دی متیل سولفوکساید (مرک- آلمان) تهیه شد. همچنین رقت های مختلف با روش سری رقت (Serial dilution) از استوک اصلی تهیه شد. در طی انجام مراحل مختلف این پژوهش، محلول های ساخته شده در شرایط مناسب درون شیشه هایی با رنگ تیره و دور از نور آفتاب نگهداری شدند. در هنگام تهیه این محلول ها از ماسک مربوطه و دستکش های لاتکس استفاده گردید (۱۳، ۱۲).

تهیه محلول فلوکونازول

جهت مقایسه اثر نانو ذرات نقره و تأثیر ضد قارچی آن ها به همراه استاندارد سازی روش های مختلف تست های تعیین حساسیت قارچ، اثر آن ها با فلوکونازول مقایسه شد. بنابراین از فلوکونازول محلول در دی متیل سولفوکساید با غلظت ۳۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد.

تست تعیین حساسیت قارچ ها به نانو ذرات نقره با استفاده از دیسک

به طور جداگانه مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه شده در هر لوله حاوی نانو ذرات نقره را بر روی دیسک های استاندارد وارد نموده و آن ها را در حرارت ۳۲ درجه سلسیوس گذاشته تا خشک شوند. محیط کشت SDA توسط ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچ مورد نظر تلقیح شد و به مدت ۵ دقیقه در حرارت اتاق قرار داده شد. سپس دیسک ها در فواصل معینی از یکدیگر بر روی محیط کشت قرار داداه شدند. نمونه ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند و وجود یا عدم وجود هاله ممانعت از رشد در اطراف دیسک‌ها بررسی گردید. از دیسک حاوی فلوکونازول به عنوان شاهد مثبت و از دیسک حاوی دی متیل سولفوکساید به عنوان شاهد منفی استفاده شد. این تست برای هر قارچ و نانو ذرات نقره ۴ بار تکرار شد (۱۴).

آزمون تعیین MIC و MFC نانوذرات نقره به روش میکرودایلوشن

جهت بررسی اثرات ضد قارچی نانو ذرات نقره حداقل غلظت مهار کنندگی از رشد قارچ (MIC) و حداقل غلظت کشنده قارچ (MFC) به روش میکرودایلوشن در میکروپلیت ۹۶ خانه ای به ترتیب مراحل زیر انجام گرفت:

ابتدا از محیط کشت سابارو دکستروز براث (مرک- آلمان) استریل ۱۰۰ میکرو لیتر داخل یک ردیف از چاهک های میکروپلیت ریخته شد. در ادامه به اولین چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از بالاترین غلظت محلول نانو نقره اضافه و خوب مخلوط شد (در این مرحله چاهک اول حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مایع استریل و ۱۰۰ میکرو لیتر محلول نانو نقره و با غلظت ۲۵۰ یا نصف غلظت اولیه است). از چاهک اول، ۱۰۰ میکرولیتر محلول برداشت گردید و به چاهک های بعدی که تنها محتوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت بود، اضافه شد. این روند از چاهک دوم به سوم و به همین ترتیب تا چاهک دهم ادامه پیدا کرد تا تمامی غلظت های مورد نظر ساخته شوند و ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک دهم دور ریخته شد تا حجم تمام چاهک ها یکسان گردد. چاهک یازدهم به عنوان کنترل مثبت حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از محیط

کشت SDB استریل و به چاهک دوازدهم ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مایع استریل به عنوان کنترل منفی ریخته شد. در ادامه به همه ی چاهک ها ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون قارچی که قبلا استاندارد سازی شده بود اضافه شد (به جز چاهک های یازدهم و دوازدهم). سپس جذب نوری توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۴۶۰-۳۲۰ نانومتر خوانده شد. پس از گذاشتن درپوش بر روی پلیت الایزا، به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵-۳۰ درجه سلسیوس انکوبه شد. سپس توسط دستگاه الایزا جذب نمونه ها مجددا خوانده شد. هر چاهکی که جذب آن بعد از انکوباسیون بیشتر از جذب قبل از انکوباسیون بود بیانگر این است که رشد قارچ در آن چاهک صورت گرفته و کدورت ایجاد شده است که این کدورت ممکن است با چشم نیز قابل مشاهده باشد. اولین چاهکی که کدورت ایجاد نشده بود و چنانچه جذب قبل و بعد از انکوباسیون تقریبا یکسان باشد به این معنی است که کدورتی ایجاد نشده و قارچ رشد نکرده است. به عبارتی نانو ذرات نقره رشد قارچ را محدود نموده اند. این چاهک حداقل غلظت مهارکنندگی را نشان می دهد. به همین ترتیب آخرین رقتی که در آن هیچ گونه کدورتی قابل تشخیص نبود (عدم رشد) به عنوان MIC در نظر گرفته شد. از دو چاهک قبل و بعد از چاهک مربوط به MIC به میزان ۱۰ میکرولیتر برداشت شد و به ظروف پتری دیش حاوی محیط کشت SDA برده شد و تمامی پتری دیش ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. غلظتی که قارچ در روی محیط کشت هیچ گونه رشدی نداشت به عنوان MFC در نظر گرفته شد. این تست برای هر قارچ ۴ بار تکرار شد (۱۶، ۱۵).

تست تعیین حساسیت قارچ ها به فلوکونازول با استفاده از دیسک

برای این کار به طور جداگانه مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از رقت تهیه شده در لوله حاوی محلول فلوکونازول را بر روی دیسک های استاندارد وارد نموده و آن ها را در حرارت ۳۲ درجه سلسیوس گذاشته تا خشک شوند. محیط کشت SDA توسط ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچ مورد نظر تلقیح شد و به مدت ۵ دقیقه در حرارت اتاق قرار داده شد. سپس دیسک ها در فواصل معینی از یکدیگر بر روی محیط کشت قرار داده می شوند. بعد از ۴۸ ساعت انکوبه نمودن در دمای ۳۰ درجه سلسیوس برای قارچ، وجود یا عدم وجود هاله ممانعت از رشد در اطراف دیسک ها بررسی گردید (۱۴).

آزمون تعیین MIC و MFC فلوکونازول به روش میکرودایلوشن

جهت بررسی اثرات ضد قارچی داروی ضد قارچی فلوکونازول حداقل غلظت مهار کنندگی از رشد قارچ (MIC) و حداقل غلظت کشنده قارچ (MFC) به روش میکرودایلوشن در میکروپلیت ۹۶ خانه ای به ترتیب مراحل زیر انجام گرفت:

ابتدا از محیط کشت سابارو دکستروز براث (SDB) استریل ۱۰۰ میکرو لیتر داخل یک ردیف از چاهک های میکرو پلیت ریخته شد.در ادامه به اولین چاهک ۱۰۰ میکرو لیتر از بالاترین غلظت محلول فلوکونازول اضافه و خوب مخلوط شد (در این مرحله چاهک اول حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مایع استریل و ۱۰۰ میکرو لیتر محلول فلوکونازول و با غلظت ۱۵۰ یا نصف غلظت اولیه است. غلظت اولیه ۳۰۰ میلی گرم در میلی لیتر بود).از چاهک اول، ۱۰۰ میکرولیتر محلول برداشت گردید و به چاهک های بعدی که تنها محتوی۱۰۰میکرولیتر محیط کشت بود، اضافه شد. این روند از چاهک دوم به سوم و به همین ترتیب تا چاهک دهم ادامه پیدا کرد تا تمامی غلظت های مورد نظر ساخته شوند. ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک دهم دور ریخته شد تا حجم تمام چاهک ها یکسان گردد. سپس به همه ی چاهک ها ۱۰ میکرو لیتر از محلول سوسپانسیون قارچی اضافه شد. چاهک یازدهم به عنوان کنترل مثبت که حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت SDB استریل و ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی مورد نظر که استاندارد سازی شده ریخته شد و در چاهک دوازدهم ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مایع استریل به عنوان کنترل منفی ریخته شد. بقیه مراحل طبق روش ذکر شده برای نانو ذرات انجام گرفت. این روش برای هر قارچ ۴ بار تکرار شد (۱۵، ۱۶).

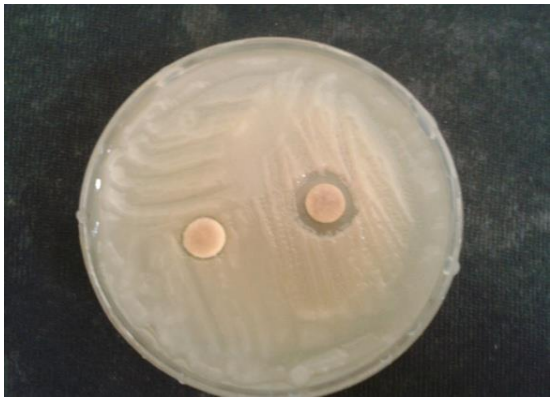
یافته‌ها

نتایج نانو ذرات نقره کروی شکل با قطر ۱۰ نانو متر در غلظت ۵۰۰ppm بر روی ۵۰ نمونه*کاندیدا آلبیکنس* آزمایش شد. میانگین قطر هاله عدم رشد در غلظت ۵۰۰ ppm برابر

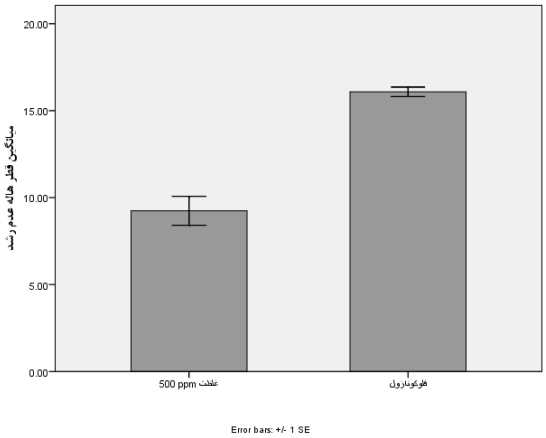
۹/۲۴±۵/۸۷ میلی متر بود که کمتر از میانگین قطر هاله عدم رشد در فلوکونازول مشاهده شد (p<۰/۰۵).

مقایسه قطر هاله عدم رشد در غلظت ۵۰۰ ppm نانو ذرات نقره و فلوکونازول:

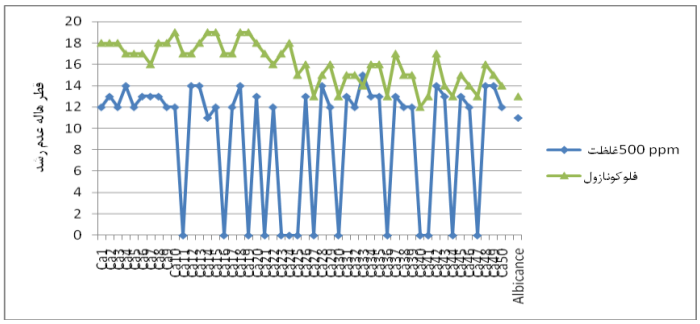
برای مقایسه مقادیر قطر هاله عدم رشد نانو نقره در غلظت ۵۰۰ppm و مقادیر قطر هاله عدم رشد در فلوکونازول، و با توجه به عدم برقراری فرض نرمال بودن مشاهدات از آزمون ناپارامتری من ویتنی استفاده شد. بر اساس نتایج بدست آمده از این آزمون مقدار آماره آزمون برابر z= -۷/۷۰۳ و سطح معناداری آزمون تقریبا برابر صفر بود (p<۰/۰۰۱). بنابراین در سطح خطای پنج درصد فرض برابری مقادیر قطر هاله عدم رشد در غلظت ۵۰۰ppm نانو نقره و فلوکونازول رد شد و میانگین قطر هاله عدم رشد در فلوکونازول بطور معناداری بزرگتر از مقادیر قطر هاله عدم رشد در نانو ذرات نقره با غلظت ۵۰۰ ppm بود. شکل ۱، هاله ممانعت از رشد در اطراف دیسک حاوی نانو ذرات نقره بعد از ۴۸ ساعت و نمودار (۱) میانگین قطر هاله عدم رشد در غلظت ۵۰۰ ppm از نانو ذرات نقره و فلوکونازول را نشان می دهد. نمودار (۲) قطر هاله عدم رشد در غلظت۵۰۰ ppm نانو نقره و فلوکونازول را برای ۵۰ نمونه بالینی و نمونه استاندارد نشان می دهد.



شکل ۱: هاله ممانعت از رشد در اطراف دیسک حاوی نانو ذرات نقره بعد از ۴۸ ساعت.



نمودار ۱: میانگین قطر هاله عدم رشد در غلظت ۵۰۰ ppm از نانو ذرات نقره و ۳۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر فلوکونازول



نمودار ۲: قطر هاله عدم رشد در غلظت ۵۰۰ ppm نانو نقره و فلوکونازول برای ۵۰ نمونه بالینی و نمونه استاندارد

بحث

نتایج به دست آمده از تأثیر نانو ذرات نقره با قطر ۱۰nm بر روی قارچ های بالینی *کاندیدا آلبیکنس* نشان دادند که این نانو ذرات در غلظت ۵۰۰ ppm دارای اثر ضد قارچی بودند اما این اثر کمتر از تأثیر فلوکونازول بود. در روش دیسک رقت ۵۰۰ ppm رشد ۳۶ نمونه از ۵۰ نمونه قارچ های مزبور را مهار کرد و رقت‌های

بعدی اثر مهاری از خود نشان ندادند. قطر هاله ی عدم رشد در روش دیسک با رقت ppm ۵۰۰، برای ایزوله های بالینی بین ۱۱ تا ۱۵ میلیمتر بود. قطر هاله عدم رشد در مورد *کاندیدا آلبیکنس* استاندارد نیز ۱۱ میلی متر بود. نتایج حاصل از MIC وMFC نیز این نتایج را تایید کردند. با توجه به اینکه قطر هاله ی ممانعت از رشد در مورد سویه ی استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* (ATCC-1677) و نانو ذرات نقره جزء کوچکترین هاله ها است می توان گفت سویه ی استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* طی گذشت زمان بسیار مقاوم شده است به طوری که نانو ذرات نقره فعالیت مهاری کمی نسبت به قارچ های بالینی بر روی این سویه داشتند. نکته ی حائز اهمیت آن است که قطر هاله ی عدم رشد نانو ذرات نقره در تمام نمونه ها کمتر از داروی ضد قارچی فلوکونازول بود. این مسئله بیانگر فعالیت مهاری کم نانو ذرات نقره در مقایسه با فلوکونازول می باشد.

با توجه به اثبات اثرات نقره بر روی مرگ سلول های باکتری و قارچ، احتمالا در تحقیق حاضر نیز این نانو ذرات با مکانیسم مشابهی با آزاد سازی رادیکال های آزاد ناشی از نانو ذرات نقره به سلول های قارچ حمله نموده و باعث دگرگون سازی میکروارگانیسم ها به وسیل تبدیل پیوند های SH به S-Ag شده اند.در این مکانیسم نانو ذرات نقره به مرور یون های نقره از خود ساطع می کنند که این یون ها طی واکنش جانشینی، باندهای SH- را در جداره ی میکروارگانیسم ها به باندهای S-Ag تبدیل می کنندکه نتیجه ی این واکنش از بین رفتن میکروارگانیسم ها است (۱۰،۱۱).

Nasrollahi و همکاران در سال ۲۰۱۱ پس از سنتز نانو ذرات نقره، فعالیت ضد قارچی آن را بر علیه دو نوع قارچ *کاندیدا آلبیکنس* و *ساکارومایسس سرویزیه* مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که نانو ذرات نقره دارای فعالیت ضد قارچی قابل توجهی بر علیه دو سویه مورد آزمایش است، میزانMIC نانوذرات نقره در علیه دو قارچ نامبرده به میزان چشمگیری کمتر از میزان MIC آمفوتریسینB و فلوکونازول بود، آنها بیان کردند که نانوذرات نقره از طریق ایجاد اختلال در پتانسیل غشایی قارچ های مذکور فعالیت ضد قارچی خود را اعمال می کند. همچنین آنالیز هایی که توسط میکروسکوپ الکترونی انجام گرفته بود نشان داد که تشکیل منافذی در غشای سیتوپلاسمی قارچ ها سبب مرگ سلولی می شود. در حالی که در تحقیق حاضر اثر نانو ذرات نقره با قطر ۱۰nm کمتر از فلوکونازول بود. با توجه به اینکه شکل و غلظت و قطر نانو ذرات در خواص آن ها تأثیرات زیادی می گذارند شاید بتوان علت تفاوت تأثیر را با توجه به خصوصیات نانو ذرات بیان کرد (۱۷).

از طرفی Noorbakhsh و همکاران در سال ۲۰۱۱ فعالیت ضد قارچی نانو ذرات نقره را به صورت جداگانه و در ترکیب با داروهای ضد قارچی بر علیه درماتوفیت پاتوژن *تریکوفیتون روبروم* (*Trichophyton rubrum*) مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که رشد این درماتوفیت در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر از نانو ذرات نقره مهار می شود. این در صورتی است که میزان MIC گریزئوفولوین و فلوکونازول به ترتیب ۰/۸ و ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود. زمانیکه این محققین نانو ذرات نقره را در ترکیب با داروهای ضد قارچی به کار بردند، در حضور ۲/۵ میکرو گرم بر میلی لیتر از نانو ذرات نقره و ۲۰ میکرو گرم بر میلی لیتر از فلوکونازول و ۲/۵ میکرو گرم بر میلی لیتر از گریزئوفولوین رشد قارچ مهار گردید. این نتایج آشکار می کند که اثرات ضد قارچی این داروها در حضور نانو ذرات نقره تقویت می گردد. این در حالی است که نانودرات نقره با قطر ۱۰ نانومتر به تنهایی و با رقت ppm ۵۰۰ توانست ۳۶ تا از ایزوله ها را مهار کند و این نانودرات در ترکیب با فلوکونازول اثر مهاری بیشتری از خود نشان ندادند (۱۸).

Martinez-Gguterrez و همکاران در سال ۲۰۱۰ پس از ساخت۱۵ نوع از نانو ذرات نقره ونانو ذرات Tio_2 و ترکیبی از این دو، فعالیت ضد میکروبی آن ها را بر علیه سویه های باکتریایی و قارچی فرصت طلب و پاتوژن مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که نانو ذرات نقره در ابعاد ۲۵-۲۰ نانومتر بیشترین فعالیت ضدباکتری را بین سایر نانو ذرات ساختگی دارا می‌باشند. هریک از نانو ذرات نقره و نانو ذرات Tio_2 به تنهایی فعالیت ضد قارچی کمی داشتند، اما زمانی که در طی دوره سنتز با یکدیگر ترکیب شدند فعالیت ضد قارچی آن ها افزایش یافت. در حالیکه در تحقیق حاضر نانو ذرات نقره با قطر ۱۰nm اثر مهاری ناچیزی بر روی قارچ های بالینی*کاندیدا آلبیکنس* و همچنین سویه ی استاندارد آن داشتند همچنین برخی از قارچ های *کاندیدا آلبیکنس* نیز مهار نشدند. ممکن است نانوذرات نقره در قطر بیشتر تأثیر مهاری بیشتری در مورد قارچ های مزبور از خود نشان دهند (۱۹).

Kim و همکاران درسال ۲۰۰۸ گزارش نمودند که فعالیت ضد قارچی نانو ذرات نقره به شکل کروی برعلیه درماتوفیتی به نام*تریکوفیتون منتاگروفیتس* (*Trichophyton mentagrophites*) و

قارچ *تریکوسپورون بژلی* (*Tricosporon begelli*) و گونه های مختلف *کاندیدا* در مقایسه با عوامل ضد قارچی موجود مانند فلوکونازول و آمفوتریسین B بیشتر است. در حالی که نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که اثر فلوکونازول بهتر از نانو ذرات نقره است. احتمالا علت تفاوت به قطر نانو ذره و غلظت آن بر می گردد (۲۰).

Kim و همکاران درسال ۲۰۰۹ فعالیت ضد قارچی نانو ذرات نقره را بر علیه *کاندیدا آلبیکنس* گزارش نمودند و نشان دادند که نانو ذرات نقره از طریق ایجاد اختلال در ساختار غشاء قارچ اثرات ضد قارچی خود را اعمال می کنند. در تحقیق حاضر نانو ذرات نقره با قطر ۱۰nm اثر مهاری چشمگیری نداشتند و اثر فلوکونازول به مراتب بهتر از نانو ذرات نقره بود (۲۱).

Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۰ عنوان کردند که نانو ساختارها و نانو ذرات به طور خاص دارای خواص فیزیک و شیمیایی منحصر به فردی هستند که این خواص می توانند به منظور تسهیل مدیریت داروهای ضد میکروبی و غلبه بر برخی محدودیت های موجود در روش های درمانی ضد میکروبی سنتی به کار روند. در مطالعه ی حاضر نانوذرات نقره کروی با قطر ۱۰ نانومتر تأثیر مهاری قابل توجهی از خود نشان ندادند، لذا جهت استفاده ی درمانی نیاز به تحقیقات بیشتری در این زمینه می باشد (۲۲).

با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق، نانوذرات نقره کروی شکل با اندازه ی ۱۰ نانو متر توانایی مهار ایزوله های *کاندیدا آلبیکنس* را دارند؛ لذا در صورت بررسی ایمن بودن نانوذرات نقره برای سلول های انسانی، ممکن است در آینده بتوان جهت درمان ولوواژینیت کاندیدایی از آن ها استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از کلیه پرسنل آزمایشگاه تحقیقاتی واحد فلاورجان- قهدریجان که در انجام مراحل مربوط به نانو ذرات نقره از هیچ کوششی در راستای انجام این پروژه دریغ ننمودند نهایت تشکر و قدردانی به عمل می آید.

تعارض منافع:

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Pakshir K, Yazdini M, Kimiaghalam R. Etiology of Vaginal Candidiasis in Shiraz, Southern Iran. Res. J. Microbiol. 2007; 2(9): 696-700.

2. Sohrabi H, Sarookhani MR, Ezani A. Identification of Candida species associated with vulvovaginal candidiasis by comparison of an innovative molecular method with culture in 2013. AMUJ. 2013; 16(77): 48-56

3. Zafarghandi A, Zabihi A, Mirdamadi Y,Rahbarian N, Abbasabadi B, Shivaei M, et al. Identification of Candida species associated with vulvovaginal candidiasis by Multiplex PCR method. TUMJ. 2009; 67(9):623-8.

4. Shokohi T, Hashemi Soteh MB, Saltanat Pouri Z, Hedayati MT, Mayahi S. Identification of Candida species using PCR-RFLP in cancer patients in Iran. Indian J. Med. microbiol. 2010; 28(2):147-51.

5. Nozari sh, Haydari Kohan F, Ashrafi Khozani M, Ahmadi F, Ghasemi Z, Nami S, Falahati M. Comparision of Antifungal effect of fluconazole alone and in combination with nanosilver particles against Candida species isolated from chronic candidal vulvovaginitis. Razi J. Med. Sci. 2012; 18(93):9-14.

6. Afsarian MH, Zaini F, Kordbacheh P, Mahmoudi M, Rezaii S, Safara M. Identification and study of non-albicans Candida species which isolated from clinical materials of patients with candidiasis. Tehran Univ Med J. 2007; 64(12): 38-47.

7. Majid Zarrin, Ali Zarei Mahmoudabadi. Invasive candidiasis; a review article. Jundishapur. J. MicrobioL. 2009; 2(1): 1-6.1

8. Abi-said D, Aniaissie E, Uzun O, Raad I, Painzcowski H, Vartivarian S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different Candida spacies. Clin.Infect.Dis. 1997; 24:1122-1128.

9. Gajebhiye M, Jayendra K, Lngle A. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticle and their activity

against pathogenic fungy in combination with fluconazole. Nanomedicin: Nanotechnol. Biol. Med. 2009; 5(4):382-386.

10. Rai M, Yadava A, Aniket Gade A. silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnol Adv. 2008; 9:1-8.

11. Sriram MI, Barath S, Kanth M, Kalishwaralal K, Gurunathan S. Antitumor activity of silver nanoparticles in Dalton's lymphoma ascites tumor model. Int. J. Nanomedicine. 2010; 5:753-62.

12. Ravikumar S Gokulakrishnan R Boomi P. In vitro antibacterial activity of the metal oxide nanoparticles against urinary tract infectious bacterial pathogens. Asian Paci. J. Trop. Dis. 2012; 85-98.

13. Jehad MY Enas ND. In Vitro Antibacterial Activity and Minimum Inhibitory Concentration of Zinc Oxide and Nano-particle Zinc oxide Against Pathogenic Strains. J. Health. Sci. 2012; 2(4):38-42.

14. Nccls: 2004, Methods for antifungal disc diffusion suseptibility testing of yeast, Approved Guideline NCELS Document M44-A. NCCLS . Wayne. Pennsylranias.

15. Pfaller M, Messer S. Coparision of visual and spectrophotometris methods of MIC and point determinations by using broth microdilution methods to test five antifungal agents including the new triazol. J. Clin. Microbiol. 1995; 33:1094-1097.

16. Galgian J, Rinadi M. Standardization of antifungal susceptibility testing. J Med & Vet Mycol. 1990; 30(1): 213-227.

17. Nasrollahi A, Pourshamsian KH, Mansourkiaee P. Antifungal activity of silver nanoparticles on some os fungi. Int. J. Nano. Dim. 2011; 1(3):233-239.

18. Noorbakhsh F, Rezaie S, Shahverdi AR. Antimicrobial effects of silver nanoparticle alone and with combination of antifungal drug on dermatophyte pathogen Thrichosporon rubrum. Imt J Biosci, Biochem Bioinforma (IJBBB). 2011; 5.

19. Martinez-Gguterrez F, Olive PL, Banuelos A. Characterization and evalution of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. Nanomedicin: Nanotechnol, Biol Med. 2010; 6(5):681-688.

20. Kim KJ, Sung WS, Moon SK, Choi JS, Kim JG, Lee DG. Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. J. Microbiol. Biotechnol. 2008; 18(8):1482-1484.

21. Kim KJ, Sung WS, Suh BK. Antifungal activity and mode of action of silver nanoparticles on Candida albicans. Biometals. 2009; 22(2):235-242.

22. Zhang L, Pornpattananangkul D, Hu CMJ, Huang CM. Developmant of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. Curr Med Chem. 2010; 17(6):585-594.