COMPLEMENTARY MEDICINE JOURNAL
Volume 14, Issue 1, Spring 2024
https://cmja.arakmu.ac.ir/

Research Article

Comparing the Anti-candidal Effect of Egg White (Machine and Local) with Amphotericin B in Vitro

Heydar Mousavi[1], Hajar Badri[2], Esmail Najafi[3], Saeed Parastar[4], Shahram Nazari[4*]

[1].Student Research Committee, Khalkhal University of Medical Sciences, Khalkhal, Iran
[2].Master, Department of Environment Health Engineering, Khalkhal University of Medical Sciences, Khalkhal, Iran
[3].Coach, Department of Public Health, Khalkhal University of Medical Sciences, Khalkhal, Iran
[4]. Assistant Professor, Department of Environment Health Engineering, Khalkhal University of Medical Sciences, Khalkhal, Iran

*** Corresponding author:** Shahram Nazari, Department of Environment Health Engineering, Khalkhal University of Medical Sciences, Khalkhal, Iran. Email: Shahramnazari73@yahoo.com

DOI: 10.32592/cmja.14.1.38

How to Cite this Article:
Mousavi H, Badri H, Najafi E, Parastar S, Nazari Sh. Comparing the Anti-candidal Effect of Egg White (Machine and Local) with Amphotericin B in Vitro. *Complement MedJ*. 2024;14(1):38-44. DOI: 10.32592/cmja.14.1.38

Received: 14 Nov 2023
Accepted: 29 Apr 2024

Keywords:
Amphotericin B
Antifungal effect
Candida albicans
Local and machine chicken egg white
© 2024 Arak University of Medical Sciences

Abstract
Introduction: The increase in the resistance of fungal species and the high side effects of antifungal drugs have led researchers to study and find new treatment methods against fungi. This study evaluated the anti-candidacy effects of local and artificial egg whites and compared them with amphotericin B.
Materials and Methods: This study was conducted experimentally in May 2023 in the Microbiology Laboratory of Khalkhal Faculty of Medical Sciences. This research tested the antifungal effects of local and machine chicken egg whites and amphotericin B using the micro broth dilution and zone of inhibition method. In this experiment, *Candida albicans* species were placed in the vicinity of different concentrations of substances, and the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicide concentration (MFC) of these substances on *C. albicans* were determined according to the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute.
This study has been registered with the ethical code IR. IR.KHALUMS.REC.1401.019 in the Ethics Committee of Khalkhal Faculty of Medical Sciences.
Results: Based on the results of the tests, the MIC of local and machine chicken egg whites on *C. albicans* was 25%, and their MFC was 50%. However, in these concentrations, no growth was observed in the presence of amphotericin B. Moreover, the MIC and MFC values of 25 µl of amphotericin B with 75 µl of local and machine egg whites were 3.125% and 6.25%, respectively. The zone of inhibition for *C. albicans* in the vicinity of local and machine chicken egg white and amphotericin B was 12, 11, and 16 mm, respectively.
Conclusion: Local and machine chicken egg whites have antifungal properties against *C. albicans*.

Copyright © 2024 The Author(s); Published by Complementary Medicine Journal. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

INTRODUCTION

Diseases of fungal origin are among the most well-known diseases that have always plagued humans from the past until now. For this reason, many efforts have been made to identify, control, and treat these pathogens. Among the different species of the genus Candida, there are at least 7 different species that are pathogenic for humans. The most important of them is *Candida albicans*, one of the most common pathogenic fungi that cause thrush in humans in different ways. *Candida albicans* is the most important microorganism that plays a role in the pathogenesis of artificial teeth. The use of antifungal compounds is largely limited due to the wide range of side effects. Toxicity and drug resistance are the main reasons for extensive research on new antifungal compounds and their therapeutic effects. Fever, chills, nausea, and kidney dysfunction are some of the symptoms that occur in some cases with the use of amphotericin B. The azole family, such as fluconazole, has hepatotoxicity. Considering these problems, it seems necessary to identify and develop new antifungal agents that have the least toxicity for host cells. Egg white consists of 88% water, 10.6% protein, 0.9% carbohydrates, and 0.5% minerals, and it is heterogeneous. Hundreds of proteins have been identified in egg whites, and several of them have antimicrobial properties. Some of these proteins, such as lysozyme and defensins, cause damage to the bacterial coating. Others act by inhibiting bacterial proteases (ovastatin, cystatin, ovalbumin) or by limiting the availability of key nutrients. Egg whites also contain significant amounts of ovotransferrin, a metal-chelating protein belonging to the transferrin family. It is generally accepted that the key process in the defense of egg whites against microbial invasion is the binding of ovotransferrin to iron, resulting in iron deficiency that disrupts microbial activity. So far, no study has been conducted in the field of determining the minimum inhibitory concentration (MIC), lethality, and halo diameter of non-growth of local and machine egg whites on *C. albicans* fungus. Therefore, the purpose of this study is to determine the diameter of the halo of non-growth and the MIC and lethal concentration of machine and local egg whites on *C. albicans* fungus in a laboratory environment and compare its antifungal power with amphotericin B.

METHODS

Researchers have used the methods of determining the halo of the non-growth or inhibition zone, the MIC, and the minimum fungicidal concentration (MFC) to investigate the effect of antimicrobial substances. Non-growth halo is used as a qualitative method to determine the resistance of a microbe to an antimicrobial agent. The MIC and the MFC will be used to quantitatively investigate the antimicrobial properties of egg whites. These values show the degree of resistance of the microorganism to the antimicrobial substance and can exhibit the best quantitative estimation sensitivity. In this study, *C. albicans* species were placed in the vicinity of different dilutions (50%, 25%, 12.5%, 6.25%, and 3.125%) of local egg white, machine egg white, and amphotericin B. The MIC, MFC, and zone of inhibition values of these compounds on *C. albicans* were determined according to the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute.

RESULTS

Based on the results of the tests, the MIC value of local egg whites on *C. albicans* was 25%, and the MFC value was 50%, showing no colony of the fungus in this dilution. The MFC value of machine egg white was 25%, and its MFC value was 50%. In this dilution, the growth of mushroom colonies was limited to less than 10, leading this concentration to be identified as the MFC. However, no growth was observed in the vicinity of amphotericin B in these dilutions.

The MIC value of 25 µl of amphotericin B combined with 75 µl of local and machine egg whites was 3.125%. Therefore, this combination can have a significant effect even in low dilutions. The zone of inhibition for *C. albicans* fungus near local egg white, machine egg white, and amphotericin B was found to be 12, 11, and 16 mm, respectively.

CONCLUSION

Local and machine egg whites have antifungal ability on *C. albicans*. Demonstrating the antifungal properties of local and machine egg whites against the *C. albicans* fungus has instilled optimism regarding the potential use of this substance or its compounds as an effective antifungal treatment with fewer possible side effects. Further research may provide the basis for its utilization as an alternative to antifungal medications with significant side effects.

Ethical Considerations

This study has been registered with the ethical code IR.KHALUMS.REC.1401.01 in the Ethics Committee of Khalkhal Faculty of Medical Sciences.

Funding

This article is the result of a research project approved by the Student Research Committee, and all the financial support for this research project was done by this committee.

Authors' Contributions

The manuscript was written with contributions from all authors. All authors have approved the final version of the manuscript. Heydar Mousavi: research, writing the original draft, methodology, and writing; Hajar Badri: review and editing;

Esmail Najafi: research and review of sources; Saeed Parasar: review and editing; Shahram Nazari: supervision and methodology.

Conflict of Interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgments

Hereby, we sincerely appreciate and thank the honorable President, Vice President, and Student Research and Technology Committee of Khalkhal Faculty of Medical Sciences for their financial and spiritual support. This research plan has the code of ethics in research (IR.KHALUMS.REC.1401.01).

مجله طب مکمل

دوره ۱۴، شماره ۱، بهار ۱۴۰۳

https://cmja.arakmu.ac.ir/

مقاله پژوهشی

مقایسه اثر ضدکاندیدایی سفیده‌ی تخم‌مرغ (ماشینی و محلی) با آمفوتریسین ب در محیط برون‌تنی

حیدر موسوی[۱]، هاجر بدری[۲]، اسماعیل نجفی[۳]، سعید پرستار[۴]، شهرام نظری[۴*]

۱. کارشناسی، گروه بهداشت عمومی، عضو کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشکده‌ی علوم پزشکی خلخال، خلخال، ایران

۲. کارشناسی ارشد، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده‌ی علوم پزشکی خلخال، خلخال، ایران

۳. مربی، گروه بهداشت عمومی، دانشگاه علوم پزشکی خلخال، خلخال، ایران

۴. استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده‌ی علوم پزشکی خلخال، خلخال، ایران

* **نویسنده مسئول:** شهرام نظری، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده‌ی علوم پزشکی خلخال، خلخال، ایران

ایمیل: Shahramnazari73@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۱۰

واژگان کلیدی:

اثر ضدقارچی

آمفوتریسین ب

سفیده‌ی تخم‌مرغ محلی و ماشینی

کاندیدا آلبیکنز

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی اراک محفوظ است.

چکیده

مقدمه: افزایش مقاومت گونه‌های قارچی و نیز عوارض جانبی نسبتاً زیاد داروهای ضدقارچی، محققان را به مطالعه و یافتن روش‌های جدید درمانی علیه قارچ‌ها وادار می‌کند. هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات ضدکاندیدایی سفیده‌ی تخم‌مرغ‌های محلی و ماشینی و مقایسه‌ی آن با آمفوتریسین ب بود.

روش کار: مطالعه به‌صورت تجربی در اردیبهشت ۱۴۰۲ در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده‌ی علوم پزشکی خلخال انجام شد. این مطالعه با استفاده از روش میکروبراث دایلوشن و قطر هاله‌ی عدم رشد، اثرات ضدقارچی سفیده‌ی تخم‌مرغ‌های محلی و ماشینی و آمفوتریسین ب را آزمایش کرد. در این مطالعه، گونه‌ی کاندیدا آلبیکنز در مجاورت رقت‌های مختلف (۵۰ درصد، ۲۵ درصد، ۱۲/۵ درصد، ۶/۲۵ درصد و ۳/۱۲۵ درصد) سفیده‌ی تخم‌مرغ‌های محلی، ماشینی و آمفوتریسین ب قرار گرفت. MIC، MFC و قطر هاله‌ی عدم رشد این ترکیبات روی کاندیدا آلبیکنز طبق دستورکارهای مؤسسه‌ی استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) تعیین شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج حاصل از آزمایش‌ها، مقدار MIC سفیده‌ی تخم‌مرغ‌های محلی و ماشینی روی کاندیدا آلبیکنز برابر با ۲۵ درصد و مقدار MFC آن‌ها برابر با ۵۰ درصد به دست آمد، درحالی‌که در این رقت‌ها، در مجاورت آمفوتریسین ب هیچ‌گونه رشدی مشاهده نشد. همچنین، مقدار MIC و MFC به‌ترتیب در صورت ترکیب ۲۵ میکرولیتر آمفوتریسین ب با ۷۵ میکرولیتر سفیده‌ی تخم‌مرغ محلی و ماشینی ۳/۱۲۵ درصد و ۶/۲۵ درصد به دست آمد. همچنین، قطر هاله‌ی عدم رشد برای قارچ کاندیدا آلبیکنز در مجاورت سفیده‌ی تخم‌مرغ محلی، ماشینی و آمفوتریسین ب به‌ترتیب برابر با ۱۲، ۱۱ و ۱۶ میلی‌متر به دست آمد.

نتیجه گیری: سفیده‌ی تخم‌مرغ‌های محلی و ماشینی دارای قابلیت ضدقارچی روی کاندیدا آلبیکنز است.

Copyright © 2024 The Author(s); Published by Complementary Medicine Journal. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

مقدمه

بیماری‌هایی که منشأ قارچی دارند، در زمره‌ی بیماری‌های شناخته‌شده‌ای هستند که از گذشته تا به حال، همواره گریبان‌گیر انسان بوده‌اند و به همین منظور، تلاش‌های زیادی برای شناخت، کنترل و درمان این عوامل بیماری‌زا صورت گرفته است (۱). جنس کلندیدا دربرگیرنده‌ی مخمرهای کروی، بیضوی یا مستطیلی‌شکل است که معمولاً از طریق جوانه زدن در جهات مختلف تکثیر می‌یابد و قادر به رشد در محیط اسیدی یا نمک زیاد است (۲). در بین گونه‌های مختلف جنس کلندیدا، حداقل ۷ گونه‌ی مختلف وجود دارد که برای انسان بیماری‌زاست (۳). مهم‌ترین آن‌ها کاندیدا آلبیکنز است که از قارچ‌های شایع بیماری‌زاست و در انسان به شکل‌های مختلف ایجاد برفک می‌کند (۴). همچنین، عفونت‌های قارچی از جمله بیماری‌های نسبتاً شایع دهانی است. دنچراستوماتیتیس التهاب مزمن غشای مخاطی است که در ناحیه‌ای که توسط دنچر پوشیده شده است، ایجاد می‌شود و در ۱۱ تا ۶۷ درصد افرادی که از دنچر متحرک استفاده می‌کنند، مشاهده می‌شود (۵). کاندیدا آلبیکنز مهم‌ترین میکروارگانیسمی است که در بیماری‌زایی دنچراستوماتیتیس نقش دارد (۶).

روش‌های مهم درمان و پیشگیری شامل رعایت بهداشت دهان و دندان‌مصنوعی و نیز تصحیح عادات استفاده از دندان‌مصنوعی است (۷). درمان‌های متعددی برای عفونت‌های قارچی ناشی از دنچر وجود دارد که از بین آن‌ها می‌توان شست‌وشو با آب‌نمک، هیپوکلریت سدیم، کلرهگزیدین و داروهای ضدقارچی موضعی و سیستمی را نام برد (۸، ۹). درمان این بیماری بسیار مشکل است و علی‌رغم استفاده از داروهای ضدقارچی، شیوع دنچراستوماتیتیس بسیار بالاست (۱۰).

مصرف ترکیبات ضدقارچی به‌علت داشتن عوارض جانبی وسیع، به میزان زیادی محدود شده است (۱۱). سمیت و مقاومت دارویی دلایل اصلی تحقیقات وسیع درباره‌ی ترکیبات ضدقارچی جدید و بررسی اثرات درمانی آن‌هاست (۱۲). تب، رعشه، حالت تهوع و اختلال در عملکرد کلیه از جمله علائمی هستند که در برخی موارد با مصرف آمفوتریسین ب به وجود می‌آیند. خانواده‌ی آزول‌ها، مانند فلوکونازول، سمیت کبدی دارند (۱۳). با در نظر گرفتن این مشکلات، شناسایی و توسعه‌ی عوامل ضدقارچی جدید که کمترین سمیت برای سلول‌های میزبان را داشته باشد، ضروری به نظر می‌رسد.

انواع مختلفی از مواد ضدمیکروبی مانند کلر، برم، ید، نیتریت و نیترات در صنایع مختلف به کار می‌رود. به‌دلیل اینکه هریک از این‌ها معایب خاص خودشان را دارند و می‌توانند باعث آسیب به سلامت انسان و محیط‌زیست شوند، یافتن مواد ضدمیکروبی جدید بر پایه‌ی آلی همواره از دغدغه‌های محققان بوده است (۱۳). یکی از این مواد ضدمیکروبی که خاصیت ضدمیکروبی بالایی دارد، سفیده‌ی تخم‌مرغ است.

سفیده‌ی تخم‌مرغ از ۸۸ درصد آب، ۱۰/۶ درصد پروتئین، ۰/۹ درصد کربوهیدرات و ۰/۵ درصد مواد معدنی تشکیل شده است، اما از نظر طبیعت ناهمگن است (۱۴). صدها پروتئین در سفیده‌ی تخم‌مرغ شناسایی شده است و تعدادی از آن‌ها خواص ضدمیکروبی دارند (۱۵). برخی از آن‌ها مانند لیزوزیم و دیفنسین‌ها باعث آسیب به پوشش باکتری می‌شوند (۱۴). برخی دیگر با مهار پروتئازهای باکتریایی (اووستاتین، سیستاتین و اووآلبومین) یا با محدود کردن دسترسی به مواد مغذی کلیدی عمل می‌کنند (۱۶). سفیده‌ی تخم‌مرغ همچنین حاوی مقادیر درخور توجهی از اووترانسفرین (۱۳ گرم در لیتر) است که یک پروتئین کلات‌کننده‌ی فلزی متعلق به خانواده‌ی ترانسفرین است (۱۷). به‌طور کلی، پذیرفته شده است که فرایند کلیدی در دفاع از سفیده‌ی تخم‌مرغ در برابر تهاجم میکروبی، اتصال اووترانسفرین به آهن است؛ بنابراین، کمبود آهن برای فعالیت میکروب‌ها اتفاق می‌افتد (۱۵).

شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد اووترانسفرین یک فعالیت ضدمیکروبی اضافی دارد که مستقل از فعالیت محدودکننده‌ی آهن آن است. به نظر می‌رسد که این فعالیت اضافی به تعامل مستقیم با غشای سلول میکروبی نیاز دارد و عملکرد غشا را مختل می‌کند (۱۸). سایر پارامترها نیز در ایمنی غیرفعال سفیده‌ی تخم‌مرغ نقش دارند و می‌توانند فعالیت پروتئین‌های ضدمیکروبی سفیده‌ی تخم‌مرغ، مانند اووترانسفرین را تعدیل کنند (۱۹). در واقع، سفیده‌ی تخم‌مرغ شرایط خاصی از pH، ویسکوزیته، ترکیب یونی و فعالیت‌های پروتئینی را ارائه می‌دهد که می‌تواند به‌طور درخور توجهی بر عملکرد ضدباکتریایی اووترانسفرین تأثیر بگذارد (۲۰). ویسکوزیته‌ی بالای سفیده‌ی تخم‌مرغ می‌تواند تحرک باکتری‌ها و دسترسی به مواد مغذی، از جمله آهن را محدود کند. pH سفیده‌ی تخم‌مرغ طی دو تا سه روز پس از تخم‌گذاری در دمای اتاق افزایش می‌یابد. این pH افزایش‌یافته به‌طور کلی بخشی از فعالیت ضدمیکروبی سفیده‌ی تخم‌مرغ شناخته می‌شود که می‌تواند بر فعالیت مولکول‌های ضدمیکروبی و همچنین، وضعیت غشای میکروبی تأثیر بگذارد (۲۱).

تاکنون مطالعه‌ای در زمینه‌ی تعیین حداقل غلظت بازدارندگی، کشندگی و قطر هاله‌ی عدم رشد سفیده‌ی تخم‌مرغ‌های محلی و ماشینی روی قارچ کاندیدا آلبیکنز انجام نشده است؛ بنابراین، هدف از این مطالعه تعیین قطر هاله‌ی عدم رشد و حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی سفیده‌ی تخم‌مرغ‌های ماشینی و محلی روی قارچ کاندیدا آلبیکنز در محیط آزمایشگاهی و مقایسه‌ی قدرت ضدقارچی آن با آمفوتریسین ب است.

روش کار

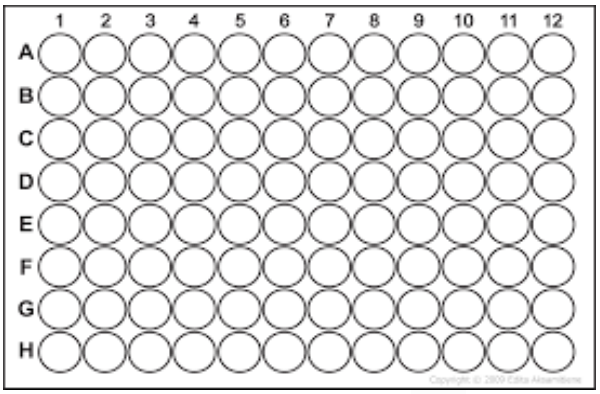
پژوهشگران روش‌های تعیین هاله‌ی عدم رشد یا ناحیه‌ی بازدارندگی (Zone of inhibition)، تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (Minimum Inhibitory Concentration) و تعیین حداقل غلظت کشندگی (Minimum fungicidal Concentration) را برای بررسی تأثیر مواد ضدمیکروبی به کار برده‌اند (۲۲، ۲۳). هاله‌ی عدم رشد به‌عنوان روشی کیفی برای تعیین مقاومت یک میکروب در برابر ماده‌ی ضدمیکروبی به کار برده می‌شود. حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی برای بررسی کمی خاصیت ضدمیکروبی سفیده‌های تخم‌مرغ به کار گرفته خواهند شد. حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی می‌توانند بهترین حساسیت برآورد کمی را داشته باشند. MIC و MFC درجه‌ی مقاومت میکروارگانیسم در برابر ماده‌ی ضدمیکروبی را نشان می‌دهند (۲۴).

قارچ کلندیدا آلبیکنز (PTCC ۵۰۲۷) تهیه‌شده از مرکز پژوهش‌های صنعتی ایران، پس از خریداری در محیط کشت سابرو دکستروز آگار (شرکت مرک، آلمان) به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس کشت داده شد. کاندیداهای تکثیریافته و جوان در محیط استریل آزمایشگاه و کنار شعله با لوپ استریل از محیط کشت سابرو دکستروز آگار برداشت شد و در آب‌مقطر استریل سوسپانسیون شد.

سپس، طول موج دستگاه اسپکتروفتومتر (DR۶۰۰۰-HACH) برای به دست آوردن استاندارد نیم مک فارلند، روی ۶۱۰ نانومتر تنظیم شد. عدد نشان‌داده‌شده توسط دستگاه درصورتی‌که در بازه‌ی ۰/۱۳-۰/۰۹ باشد، نشانگر کدورتی است که در هر میلی‌لیتر از آن، $1/5 \times 10^5$ عدد سلول مخمر وجود دارد. درصورتی‌که عدد نشان‌داده‌شده توسط دستگاه از بازه‌ی مدنظر پایین‌تر باشد، با افزودن کلنی مخمر میزان کدورت آن را افزایش می‌دهیم. همچنین، در صورت بالاتر بودن آن عدد از بازه‌ی مدنظر، سوسپانسیون را با

آب‌مقطر رقیق می‌کنیم. آزمایش‌های حداقل غلظت بازدارندگی MIC و MFC با استفاده از روش رقیق‌سازی میکرو بر اساس روش توصیه‌شده توسط CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) انجام شد (۲۵).

در این روش، از میکروچاهک‌ها (شکل ۱) برای تعیین اثر ضدقارچی رقت‌های مختلف سفیده‌ی تخم‌مرغ‌های محلی و ماشینی و آمفوتریسین ب استفاده شد. یک چاهک شاهد برای کنترل مثبت و یک چاهک شاهد برای کنترل منفی استفاده شد. شاهد مثبت حاوی محیط کشت سابرودکستروز براث و قارچ بود که ماده‌ی ضدقارچی به آن اضافه نشده بود. همچنین، شاهد منفی فقط حاوی محیط کشت بود. برای تعیین مقدار دقیق MIC و MFC سفیده‌ی تخم‌مرغ‌های محلی و ماشینی در مقابل قارچ کاندیدا آلبیکنز، آزمایش‌ها با رقت‌های مختلف (۵۰ درصد، ۲۵ درصد، ۱۲/۵ درصد، ۶/۲۵ درصد و ۳/۱۲۵ درصد) سفیده‌ی هر تخم‌مرغ به‌صورت رقیق‌سازی سریالی انجام داده شد. به هر چاهک از ردیف A (شکل ۱) که شامل ۱۲ چاهک است، ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت سابرودکستروز براث استریل ریخته شد. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از سفیده‌ی تخم‌مرغ به چاهک شماره‌ی A۱ ریخته شد و چندین بار پیپت شد و سپس، از چاهک A۱، ۱۰۰ میکرولیتر برداشت شد و به چاهک A۲ انتقال داده شد. این عملیات رقیق‌سازی تا چاهک A۱۰ انجام داده شد و غلظت سفیده‌ی تخم‌مرغ در خانه‌ی A۱۰ به اندازه‌ی ^{10} ۰/۵ برابر غلظت اولیه کاهش یافت. چاهک‌های A۱۱ و A۱۲ به‌ترتیب کنترل مثبت و کنترل منفی در نظر گرفته شدند. سپس، ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمر آماده‌شده با غلظت ۰/۱ برابر نیم مک فارلند به همه‌ی چاهک‌ها، به‌جز چاهک کنترل منفی اضافه شد. سپس، میکروپلیت به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شد. پس از طی زمان ۷۲ ساعت، چاهک‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد قارچ تلقیح‌شده بررسی شدند. چاهکی که کمترین غلظت از سفیده‌ی تخم‌مرغ را داشت و رشد قارچ در آن مشاهده نشده بود، MIC در نظر گرفته شد. برای تعیین MFC سفیده‌ی تخم‌مرغ‌ها، از چاهک‌هایی که رشد در آن‌ها مشاهده نشده بود، ۱۰ میکرولیتر روی محیط کشت سابرودکستروز آگار کشت داده شد و در گرمخانه در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شد. بعد از گرماگذاری، پلیت مربوط به چاهکی که حاوی کمترین غلظت از سفیده‌ی تخم‌مرغ‌ها بود و رشد قارچ برابر یا کمتر از ۱۱ کلنی در آن مشاهده شده بود، MFC در نظر گرفته شد. تمامی این عملیات در زیر هود استریل انجام شد. آزمایش‌های MIC و MFC به‌صورت ترکیب ۲۵ میکرولیتر آمفوتریسین با ۷۵ میکرولیتر سفیده‌ی تخم‌مرغ‌های محلی و ماشینی به‌صورت مجزا هم انجام شد.



شکل ۱: میکروچاهک‌ها برای تعیین MIC و MFC

روش دیسک آگار دیفیوژن (ZOI)

از کدورت سوسپانسیون تهیه‌شده مطابق با استاندارد نیم مک فارلند در پلیت‌های حاوی محیط کشت سابرودکستروز آگار به‌وسیله‌ی سواپ استریل به‌صورت یکنواخت کشت داده شدند. سپس، دیسک‌های خالی (Blank disk) ۶میلی‌متری در شرایط کاملاً استریل به ۵۰ میکرولیتر از سفیده‌ی تخم‌مرغ‌ها و آمفوتریسین ب آغشته شد و به‌منظور خشک شدن، به مدت ۳۰ دقیقه در گرمخانه در دمای ۳۰ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شد و سپس، دیسک‌ها در داخل پلیت‌ها به فاصله‌ی مناسب قرار گرفت و پس از گرمخانه‌گذاری به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس، قطر هاله‌ی عدم رشد به‌وسیله‌ی خط‌کش برای هریک از آن‌ها اندازه‌گیری و برحسب میلی‌متر گزارش شد (۲۵).

یافته‌ها

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC)

بر اساس نتایج حاصل از آزمایش‌ها، مقدار MIC سفیده‌ی تخم‌مرغ‌های محلی روی کاندیدا آلبیکنز برابر با ۲۵ درصد و مقدار MFC آن برابر با ۵۰ درصد به دست آمد، به‌طوری که در این رقت هیچ کلنی از قارچ مشاهده نشد (شکل ۲. الف). همچنین، مقدار MFC سفیده‌ی تخم‌مرغ‌های ماشینی برابر با ۲۵ درصد و مقدار MFC آن برابر با ۵۰ درصد به دست آمد، به‌طوری که در این رقت تعداد کلنی‌های قارچ رشدکرده کمتر از ۱۰ کلنی بود و این رقت MFC در نظر گرفته شد (شکل ۲. ب). درحالی‌که در این رقت‌ها، در مجاورت آمفوتریسین ب، هیچ‌گونه رشدی مشاهده نشد.

مقدار MIC در صورت ترکیب ۲۵ میکرولیتر آمفوتریسین ب با ۷۵ میکرولیتر سفیده‌ی تخم‌مرغ‌های محلی و ماشینی برابر با ۳/۱۲۵ درصد به دست آمد، به‌طوری که این ترکیب در رقت‌های پایین هم می‌تولند تأثیر درخور توجهی داشته باشد. مقدار MFC در صورت ترکیب ۲۵ میکرولیتر آمفوتریسین ب با ۷۵ میکرولیتر سفیده‌ی تخم‌مرغ‌های محلی (شکل۳. الف) و ماشینی (شکل ۳. ب) برابر با ۳/۱۲۵ درصد به دست آمد، به‌طوری که این ترکیب در رقت‌های پایین هم می‌تواند اثر درخور توجهی داشته باشد.

الف ب

شکل ۲: نتایج MFC تخم‌مرغ‌های محلی و ماشینی

تعیین قطر هاله‌ی عدم رشد

قطر هاله‌ی عدم رشد برای قارچ کاندیدا آلبیکنز در مجاورت سفیده‌ی تخم‌مرغ محلی، ماشینی و آمفوتریسین ب به‌ترتیب برابر با ۱۲، ۱۱ و ۱۶ میلی‌متر به دست آمد (شکل ۳).

الف ب

شکل ۳: نتایج MFC ترکیب تخم‌مرغ‌های محلی و ماشینی با آمفوتریسین ب

بحث

مقایسه‌ی داده‌های به‌دست‌آمده از آزمایش MIC سفیده‌ی تخم‌مرغ‌های محلی و ماشینی با یکدیگر نشان داد که سفیده‌ی تخم‌مرغ‌های محلی و سفیده‌ی تخم‌مرغ‌های ماشینی اثرات بازدارندگی تقریباً برابری دارند که این اثر در چاهک شماره‌ی دوم یا رقت ۲۵ درصد به دست آمد. این در حالی است که در حضور آمفوتریسین ب رشدی مشاهده نشد. همچنین، مقایسه‌ی نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش MFC سفیده‌ی تخم‌مرغ‌های محلی و ماشینی با یکدیگر نشان داد که سفیده‌ی تخم‌مرغ‌های محلی و سفیده‌ی تخم‌مرغ‌های ماشینی در چاهک اول یا رقت ۵۰ درصد اثر قارچ‌کشی دارند. این در حالی بود که در این رقت و در حضور سفیده‌ی تخم‌مرغ محلی، هیچ کلنی از قارچ رؤیت نشد. اما در مجاورت سفیده‌ی تخم‌مرغ ماشینی، کلنی‌هایی از قارچ مشاهده شد. ولی چون تعداد آن کمتر از ۱۱ کلنی بود، MFC سفیده‌ی تخم‌مرغ‌های ماشینی در نظر گرفته شد. بنابراین می‌توان با نتایج حاصل از MFC میزان اثرات ضدقارچی سفیده‌ی تخم‌مرغ‌های محلی و ماشینی را مقایسه کرد و نشان داد که این اثر در سفیده‌ی تخم‌مرغ‌های ماشینی بیشتر است. همچنین، نتایج آزمایش قطر هاله‌ی عدم رشد نشان داد که قطر هاله‌ی عدم رشد برای قارچ کاندیدا آلبیکنز در مجاورت سفیده‌ی تخم‌مرغ محلی، ماشینی و آمفوتریسین ب به‌ترتیب برابر با ۱۲، ۱۱ و ۱۶ میلی‌متر است که با نتایج حاصل از آزمایش‌های MIC و MFC کاملاً مطابقت دارد. به‌دلیل کمی بودن روش MIC و MFC، نتایج این آزمایش‌ها نسبت به روش قطر هاله‌ی عدم رشد که روشی کیفی محسوب می‌شود، برتری دارد. این مطالعه نشان داد مواد مؤثری که اثرات ضدقارچی دارد، در سفیده‌ی تخم‌مرغ‌های محلی بیشتر از ماشینی است. یکی از این مواد می‌تواند آنزیم‌های لیزوزیم و دیفنسین باشد که روی غشا تأثیر می‌گذارد. برخی دیگر نیز مثل اووستاتین، سیستاتین و اووآلبومین از دسترسی قارچ به مواد مغذی برای رشد ممانعت می‌کنند. ماده‌ی دیگری که می‌تواند اثر ضدقارچی داشته باشد، اووترانسفرین است که به‌عنوان کلات‌کننده‌ی فلزی با اتصال به آهن باعث کاهش آهن مصرفی برای قارچ می‌شود. همچنین، با اثر روی غشا، نفوذپذیری آن را مختل می‌کند و در نتیجه، کنترل ورود و خروج مواد از غشای ازبین‌رفته و قارچ از بین می‌رود. مطالعه‌ای که کولاز و همکاران در سال ۲۰۱۰ درباره‌ی فعالیت ضدقارچی سفیده‌ی تخم‌مرغ روی قارچ کلندیدا انجام دادند، نشان داد که سفیده‌ی تخم‌مرغ در محدوده‌ی رقت‌های ۰/۸ تا ۳/۳ میکرومول در لیتر اثر بازدارندگی مناسبی روی قارچ کاندیدا دارد (۲۶). همچنین، در مطالعه‌ای که شیمازاکی و همکاران در سال ۲۰۱۸ درباره‌ی خاصیت ضدمیکروبی آنزیم لیزوزیم سفیده‌ی تخم‌مرغ انجام دادند، مشخص شد که این آنزیم فعالیت باکتریولیتیک علیه باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس و اشریشیا کلی دارد (۲۷). تب، رعشه، حالت تهوع و اختلال در عملکرد کلیه از جمله علائمی هستند که ممکن است به دنبال استفاده از آمفوتریسین ب در افراد ظاهر شود؛ بنابراین، هرچه مقدار مصرف آن کمتر باشد، عوارض آن نیز کمتر خواهد شد. در این مطالعه به‌منظور به حداقل رساندن استفاده از آمفوتریسین ب، این ماده با نسبت یک به سه با تخم‌مرغ‌های محلی و ماشینی ترکیب شد و در مجاورت با قارچ جهت بررسی اثرات ضدقارچی قرار داده شد. به‌طوری که هم در ترکیب با تخم‌مرغ محلی و هم ماشینی در رقت ۳/۱۲۵ درصد اثر قارچ‌کشی داشت و انتظار می‌رود در رقت‌های بالاتر هم اثر درخور توجهی داشته باشد. مورینو و همکاران در سال ۲۰۲۱، فعالیت ضدقارچی آرژنین فنیل آلانین و آرژنین تریپتوفان را بررسی کردند. حداقل غلظت بازدارندگی برای هر دو ترکیب برابر با ۸/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد (۲۸). در مطالعه‌ای که آزودو و همکارانش در سال ۲۰۱۴ انجام دادند، فعالیت ضدباکتریایی PEI روی بیوفیلم و باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس، استافیلوکوک اپیدرمیس، آسینتوباکتر بومانی و نیز اثر ضدقارچی آن علیه کاندیدا آلبیکنز (سویه‌های بالینی و ATCC) ارزیابی شد. آن‌ها در این مطالعه دریافتند که PEI روی تمامی سوش‌های میکروبی مورد مطالعه اثر بازدارندگی دارد (۲۹).

نتیجه‌گیری

اثبات فعالیت ضدقارچی سفیده‌ی تخم‌مرغ‌های محلی و ماشینی روی قارچ کاندیدا آلبیکنز این امیدواری را ایجاد کرد تا بتوان این ماده یا ترکیبات آن را به‌عنوان داروی ضدقارچی مناسب با عوارض جانبی احتمالی کمتر مدنظر قرار داد و با انجام تحقیقات بیشتر، بتوان آن را جایگزینی برای داروهای ضدقارچی که عوارض درخور توجهی دارند، در نظر گرفت. انجام تحقیقات بیشتر درباره‌ی طیف وسیع‌تری از قارچ‌ها و در پی آن، تحقیق درباره‌ی نمونه‌های بالینی و بیماران مبتلا به عفونت‌های قارچی، از جمله موارد اصلی برای نیل به این هدف خواهد بود. بنابراین، در تحقیقات بعدی پیشنهاد می‌شود که نسبت‌های مختلف از ترکیب آمفوتریسین ب با تخم‌مرغ مطالعه شود تا کمترین نسبت استفاده از آمفوتریسین ب در ترکیب با تخم‌مرغ به دست آید و در صورت امکان، ارزیابی اقتصادی برای سنتز و کاربرد گسترده‌ی آن صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب معاونت پژوهشی دانشکده‌ی علوم پزشکی خلخال با کد اخلاق IR.KHALUMS.REC.1401.019 و حمایت مالی معاونت پژوهشی است. هیچ‌گونه تعارضی بین نویسندگان و دستگاه‌های مرتبط برای انتشار این مقاله وجود ندارد. بدین‌وسیله، از معاونت پژوهشی، کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی و پرسنل محترم آزمایشگاهی به‌دلیل همکاری صمیمانه‌شان تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Odds FC. Candida infections: an overview. Crit Rev Microbiol. 1987;15(1):1-5. doi: 10.3109/10408418709104444 pmid: 3319417
2. Lockhart SR. Current epidemiology of Candida infection. Clinical Microbiology Newsletter. 2014;36(17):131-6. doi: 10.1016/j.clinmicnews.2014.08.001
3. Bouchelaghem S. Propolis characterization and antimicrobial activities against Staphylococcus aureus and Candida albicans: A review. Saudi J Biol Sci. 2022;29(4):1936-1946. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.11.063 pmid: 35531223
4. Boroujeni ZB, Shamsaei S, Yarahmadi M, Getso MI, Khorashad AS, Haghighi L, et al. Distribution of invasive fungal infections: Molecular epidemiology, etiology, clinical conditions, diagnosis and risk factors: A 3-year experience with 490 patients under intensive care. Microb Pathog. 2021;152:104616. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104616 pmid: 33212195
5. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. J Prosthodont. 2011;20(4):251-60. doi: 10.1111/j.1532-849X.2011.00698.x pmid: 21463383
6. Alonso GC, Klein MI, Jordão CC, Carmello JC, Pavarina AC. Gene expression of Candida albicans strains isolates from patients with denture stomatitis submitted to treatments with photodynamic therapy and nystatin. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2021;35:102292. doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102292 pmid: 33857598
7. Taher JM, Raheem NN. Role of purified beta-glucanase from lactobacillus acidophilus in disruption of biofilm formation by candida spp. causing of denture stomatitis. Materials Today: Proceedings. 2022;60(22):1507-12. doi: 10.1016/j.matpr.2021.12.021
8. Yarborough A, Cooper L, Duqum I, Mendonça G, McGraw K, Stoner L. Evidence regarding the treatment of denture stomatitis. J Prosthodont. 2016;25(4):288-301. doi: 10.1111/jopr.12454 pmid: 27062660
9. Lombardi T, Budtz-Jørgensen E. Treatment of denture-induced stomatitis: a review. Eur J Prosthodont Restor Dent. 1993;2(1):17-22. pmid: 8180613
10. Rathee M, Maqbul Alam DPJ, Shetye A. Prosthodontic management of a completely edentulous diabetic patient with Mucormycosis- a case report. From the Editor's Desk. 2022.
11. Budtz-Jörgensen E, LöE H. Chlorhexidine as a denture disinfectant in the treatment of denture stomatitis. Scand J Dent Res. 1972;80(6):457-64. doi: 10.1111/j.1600-0722.1972.tb00314.x pmid: 4575037
12. Petrović M, Kostić M, Kostić M, Krunić N, Igić M, Pešić Z, et al. Therapeutic alternatives of natural compounds in treatment of Candida-associated denture stomatitis. Acta Medica Medianae. 2014;53(1):73-9. doi: 10.5633/amm.2014.0113
13. Nasrollahi A, Pourshamsian K, Mansourkiaee P. Antifungal activity of silver nanoparticles on some of fungi. Int J Nano Dim. 2011:1(3):233-239. doi: 10.7508/ijnd.2010.03.007
14. Jalili-Firoozinezhad S, Filippi M, Mohabatpour F, Letourneur D, Scherberich A. Chicken egg white: Hatching of a new old biomaterial. Materials Today. 2020;40:193-214. doi: 10.1016/j.mattod.2020.05.022
15. Legros J, Jan S, Bonnassie S, Gautier M, Croguennec T, Pezennec S, et al. The role of ovotransferrin in egg-white antimicrobial activity: A review. Foods. 2021;10(4):823. doi: 10.3390/foods10040823 pmid: 33920211
16. Feeney RE, Nagy DA. The antibacterial activity of the egg white protein conalbumin. J Bacteriol. 1952;64(5):629-43. doi: 10.1128/jb.64.5.629-643.1952 pmid: 12999693
17. Carrillo W, García-Ruiz A, Recio I, Moreno-Arribas M. Antibacterial activity of hen egg white lysozyme modified by heat and enzymatic treatments against oenological lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. J Food Prot. 2014;77(10):1732-9. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-009 pmid: 25285490
18. Wellman-Labadie O, Picman J, Hincke M. Comparative antibacterial activity of avian egg white protein extracts. Br Poult Sci. 2008;49(2):125-32. doi: 10.1080/00071660801938825 pmid:18409086
19. Huang X, Zhou X, Jia B, Li N, Jia J, He M, et al. Transcriptional sequencing uncovers survival mechanisms of Salmonella enterica serovar Enteritidis in antibacterial egg white. mSphere. 2019;4(1):e00700-18. doi: 10.1128/mSphere.00700-18 pmid: 30760616
20. Ma B, Guo Y, Fu X, Jin Y. Identification and antimicrobial mechanisms of a novel peptide derived from egg white ovotransferrin hydrolysates. Lwt. 2020;131:109720. doi: 10.1016/j.lwt.2020.109720
21. Brand J, Dachmann E, Pichler M, Lotz S, Kulozik U. A novel approach for lysozyme and ovotransferrin fractionation from egg white by radial flow membrane adsorption chromatography: Impact of product and process variables. Separation and Purification Technology. 2016;161:44-52. doi: 10.1016/j.seppur.2016.01.032
22. Salimpour Abkenar S, Mohammad Ali Malek R. Preparation, characterization, and antimicrobial property of cotton cellulose fabric grafted with poly (propylene imine) dendrimer. Cellulose. 2012;19:1701-14. doi: 10.1007%2Fs10570-012-9744-y
23. Strydom SJ, Rose WE, Otto DP, Liebenberg W, De Villiers MM. Poly (amidoamine) dendrimer-mediated synthesis and stabilization of silver sulfonamide nanoparticles with increased antibacterial activity. Nanomedicine. 2013;9(1):85-93. doi: 10.1016/j.nano.2012.03.006 pmid: 22470054
24. Gholami M, Mohammadi R, Arzanlou M, Akbari Dourbash F, Kouhsari E, Majidi G, et al. In vitro antibacterial activity of poly (amidoamine)-G7 dendrimer. BMC Infect Dis. 2017;17(1):395. doi: 10.1186/s12879-017-2513-7 pmid: 28583153
25. Cantón E, Espinel-Ingroff A, Pemán J. Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. Expert Rev Anti Infect Ther. 2009;7(1):107-19. doi: 10.1586/14787210.7.1.107 pmid: 19622060
26. Kolaczkowska A, Kolaczkowski M, Sokolowska A, Miecznikowska H, Kubiak A, Rolka K, et al. The antifungal properties of chicken egg cystatin against Candida yeast isolates showing different levels of azole resistance. Mycoses. 2010;53(4):314-20. doi: 10.1111/j.1439-0507.2009.01722.x pmid: 19549107
27. Shimazaki Y, Takahashi A. Antibacterial activity of lysozyme-binding proteins from chicken egg white. J Microbiol Methods. 2018;154:19-24. doi: 10.1016/j.mimet.2018.10.001 pmid: 30291881
28. Moreno LSS, Junior HVN, da Silva AR, do Nascimento FBSA, da Silva CR, de Andrade Neto JB, et al. Arginine-phenylalanine and arginine-tryptophan-based surfactants as new biocompatible antifungal agents and their synergistic effect with Amphotericin B against fluconazole-resistant Candida strains. Colloids Surf B Biointerfaces. 2021;207:112017. doi: 10.1016/j.colsurfb.2021.112017 pmid: 34391169
29. Azevedo M, Ramalho P, Silva A, Teixeira-Santos R, Pina-Vaz C, Rodrigues A. Polyethyleneimine and polyethyleneimine-based nanoparticles: novel bacterial and yeast biofilm inhibitors. J Med Microbiol. 2014;63(9):1167-1173. doi: 10.1099/jmm.0.069609-0 pmid: 24913563