








Research Article

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

Heydar Mousavi¹ , Hajar Badri² , Esmail Najafi³ , Saeed Parastar⁴ , 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](https://doi.org/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 Med J*. 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*.

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 MIC 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).



مقایسه اثر ضدکاندیدایی سفیده تخم مرغ (ماشینی و محلی) با آمفوتریسین ب در محیط برون تنی

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

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۱۰

واژگان کلیدی:

اثر ضدقارچی
آمفوتریسین ب
سفیده‌ی تخم مرغ محلی و
ماشینی
کاندیدا آلبیکنز

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه
علوم پزشکی اراک محفوظ است.

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 تخم مرغ‌های محلی و ماشینی و مقایسه‌ی آن با آمفوتریسین ب بود.

روش کار: مطالعه به صورت تجربی در اردیبهشت ۱۴۰۲ در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده‌ی علوم پزشکی خلخال انجام شد. این مطالعه با استفاده از روش میکروبراث دابلوشن و قطر هاله‌ی عدم رشد، اثرات ضدقارچی سفیده‌ی تخم مرغ‌های 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 تخم مرغ‌های 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 تخم مرغ‌های 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 به ترتیب در صورت ترکیب ۲۵ میکرولیتر آمفوتریسین ب با ۷۵ میکرولیتر سفیده‌ی تخم مرغ 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 تخم مرغ محلی، ماشینی و آمفوتریسین ب به ترتیب برابر با ۱۲، ۱۱ و ۱۶ میلی‌متر به دست آمد.

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

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 میکروپها اتفاق می‌افتد (۱۵).

شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد اووترانسفرین یک فعالیت ضد میکروبی 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 ضد میکروبی 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 افزایش یافته به‌طور کلی بخشی از فعالیت ضد میکروبی سفیده‌ی تخم‌مرغ شناخته می‌شود که می‌تواند بر فعالیت مولکول‌های ضد میکروبی 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 آموتریسین 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 ضد میکروبی به کار برده‌اند (۲۲، ۲۳). هاله‌ی عدم رشد به‌عنوان روشی کیفی برای تعیین مقاومت یک میکروب در برابر ماده‌ی ضد میکروبی به کار برده می‌شود. حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی برای بررسی کمی خاصیت ضد میکروبی سفیده‌ی 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 ضد میکروبی را نشان می‌دهند (۲۴).

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

سپس، طول موج دستگاه اسپکتروفتومتر (DR۶۰۰۰-HACH) برای به دست آوردن استاندارد نیم مک فارلند، روی ۶۱۰ نانومتر تنظیم شد. عدد نشان داده‌شده توسط دستگاه در صورتی که در بازه‌ی ۰/۱۳-۰/۹ باشد، نشانگر کدورتی است که در هر میلی‌لیتر از آن، $1/5 \times 10^5$ عدد سلول مخمر وجود دارد. در صورتی که عدد نشان داده‌شده توسط دستگاه از بازه‌ی مدنظر پایین‌تر نباشد، با افزودن کلنی مخمر میزان کدورت آن را افزایش می‌دهیم. همچنین، در صورت بالاتر بودن آن عدد از بازه‌ی مدنظر، سوسپانسیون را با

بیماری‌هایی که منشأ قارچی دارند، در زمره‌ی بیماری‌های شناخته‌شده‌ی 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 کاندیدا 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 کاندیدا، 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 دندان مصنوعی و نیز تصحیح عادات استفاده از دندان مصنوعی 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). 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 آموتریسین ب به وجود می‌آیند. خانواده‌ی آزول‌ها، مانند فلوکونازول، سمیت کبیدی 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 ضد میکروبی مانند کلر، برم، ید، نیتريت 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 ضد میکروبی جدید بر پایه‌ی آلی همواره از دغدغه‌های محققان بوده است (۱۳). یکی از این مواد ضد میکروبی که خاصیت ضد میکروبی 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 ضد میکروبی دارند (۱۵). برخی از آن‌ها مانند لیوزیم و دیفنسین‌ها باعث آسیب به پوشش باکتری می‌شوند (۱۴). برخی دیگر با مهار پروتئازهای باکتریایی (اوستاتین، 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

روش دیسک آگار دیفیوژن (ZOI)

از کدورت سوسپانسیون تهیه شده مطابق با استاندارد نیم مک فارلند در پلیت‌های حاوی محیط کشت سابوردکستروز آگار به‌وسیله سوپ استریل به‌صورت یکنواخت کشت داده شدند. سپس، دیسک‌های خالی (Blank disk) ۶ میلی‌متری در شرایط کاملاً استریل به ۵۰ میکرولیتر از سفیده 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 هر یک 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 رشد کرده 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 می‌تواند تأثیر درخور توجهی داشته باشد. مقدار MFC در صورت ترکیب ۲۵ میکرولیتر آمفوتریسین ب با ۷۵ میکرولیتر سفیده‌ی تخم‌مرغ‌های محلی (شکل ۳. 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.



ب

الف

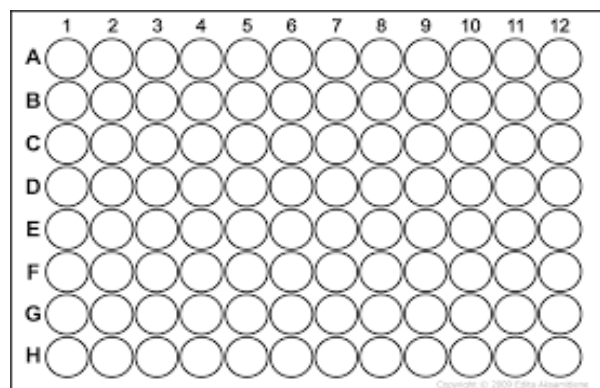
شکل ۲: نتایج MFC تخم‌مرغ‌های محلی و ماشینی

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 ۱۱، ۱۲ و ۱۶ میلی‌متر به دست آمد (شکل ۳).

آب‌مقطر رقیق می‌کنیم. آزمایش‌های حداقل غلظت بازدارندگی MIC و MFC با استفاده از روش رقیق‌سازی میکرو بر اساس روش توصیه‌شده توسط (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 سابوردکستروز 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 سابوردکستروز براث استریل ریخته شد. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از سفیده‌ی تخم‌مرغ به چاهک شماره‌ی A1 ریخته شد و چندین بار پیمت شد و سپس، از چاهک A1، ۱۰۰ میکرولیتر برداشت شد و به چاهک A2 انتقال داده شد. این عملیات رقیق‌سازی تا چاهک A10 انجام داده شد و غلظت سفیده‌ی تخم‌مرغ در خانه‌ی A10 به اندازه‌ی ۱۰^{-۱۰} برابر غلظت اولیه کاهش یافت. چاهک‌های A11 و A12 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 سابوردکستروز آگار کشت داده شد و در گرم‌خانه در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت گرم‌گذاری شد. بعد از گرم‌گذاری، 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 ب با ۷۵ میکرولیتر سفیده‌ی تخم‌مرغ‌های محلی و ماشینی به‌صورت مجزا هم انجام شد.



شکل ۱: میکروچاهک‌ها برای تعیین MIC و MFC

خاصیت ضد میکروبی آنزیم لیزوزیم سفیده‌ی تخم مرغ انجام دادند، مشخص شد که این آنزیم فعالیت باکتریولیتیک علیه باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس و اشیشیا 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 به منظور به حداقل رساندن استفاده از آمفوتریسین ب، این ماده با نسبت یک به سه با تخم مرغ‌های محلی و ماشینی ترکیب شد و در مجاورت با قارچ جهت بررسی اثرات ضدقارچی قرار داده شد. به طوری که هم در ترکیب با تخم مرغ 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 آزدو و همکارانش در سال ۲۰۱۴ انجام دادند، فعالیت ضدباکتریایی PEI روی بیوفیلیم 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 تخم مرغ‌های 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 تخم مرغ مطالعه شود تا کمترین نسبت استفاده از آمفوتریسین ب در ترکیب با تخم مرغ 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.



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

بحث

مقایسه‌ی داده‌های به‌دست‌آمده از آزمایش MIC سفیده‌ی تخم مرغ‌های محلی و ماشینی با یکدیگر نشان داد که سفیده‌ی تخم مرغ‌های محلی و سفیده‌ی تخم مرغ‌های ماشینی اثرات بازدارندگی تقریباً برابری دارند که این اثر در چاهک شماره‌ی دوم با 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 تخم مرغ‌های محلی و ماشینی با یکدیگر نشان داد که سفیده‌ی تخم مرغ‌های محلی و سفیده‌ی تخم مرغ‌های ماشینی در چاهک اول یا رقت ۵۰ درصد اثر قارچ‌کشی دارند. این در حالی بود که در این رقت و در حضور سفیده‌ی تخم مرغ محلی، هیچ کلنی از قارچ رؤیت نشد. اما در مجاورت سفیده‌ی تخم مرغ ماشینی، کلنی‌هایی از قارچ مشاهده شد. ولی چون تعداد آن کمتر از ۱۱ کلنی بود، MFC سفیده‌ی تخم مرغ‌های ماشینی در نظر گرفته شد. بنابراین می‌توان با نتایج حاصل از MFC میزان اثرات ضدقارچی سفیده‌ی تخم مرغ‌های محلی و ماشینی را مقایسه کرد و نشان داد که این اثر در سفیده‌ی تخم مرغ‌های ماشینی بیشتر است. همچنین، نتایج آزمایش قطر هاله‌ی عدم رشد نشان داد که قطر هاله‌ی عدم رشد برای قارچ کاندیدا آلبیکنز در مجاورت سفیده‌ی تخم مرغ محلی، ماشینی و آمفوتریسین ب به ترتیب 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 تخم مرغ‌های 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 دسترس 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 از بین رفته و قارچ از بین می‌رود. مطالعه‌ای که کولاز و همکاران در سال ۲۰۱۰ درباره‌ی فعالیت ضدقارچی سفیده‌ی تخم مرغ روی قارچ کلندیدا انجام دادند، نشان داد که سفیده‌ی تخم مرغ 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

References

- Odds FC. Candida infections: an overview. *Crit Rev Microbiol.* 1987;15(1):1-5. doi: [10.3109/10408418709104444](https://doi.org/10.3109/10408418709104444) pmid: 3319417
- Lockhart SR. Current epidemiology of Candida infection. *Clinical Microbiology Newsletter.* 2014;36(17):131-6. doi: [10.1016/j.clinmicnews.2014.08.001](https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2014.08.001)
- 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](https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.11.063) pmid: 35531223
- 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](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104616) pmid: 33212195
- 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](https://doi.org/10.1111/j.1532-849X.2011.00698.x) pmid: 21463383
- 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](https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102292) pmid: 33857598
- 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](https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.12.021)
- 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](https://doi.org/10.1111/jopr.12454) pmid: 27062660
- Lombardi T, Budtz-Jørgensen E. Treatment of denture-induced stomatitis: a review. *Eur J Prosthodont Restor Dent.* 1993;2(1):17-22. pmid: 8180613
- 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.
- Budtz-Jørgensen E, LøE 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](https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1972.tb00314.x) pmid: 4575037
- 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](https://doi.org/10.5633/amm.2014.0113)
- 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](https://doi.org/10.7508/ijnd.2010.03.007)
- 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.matod.2020.05.022](https://doi.org/10.1016/j.matod.2020.05.022)
- 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](https://doi.org/10.3390/foods10040823) pmid: 33920211
- 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](https://doi.org/10.1128/jb.64.5.629-643.1952) pmid: 12999693
- 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](https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-009) pmid: 25285490
- 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](https://doi.org/10.1080/00071660801938825) pmid:18409086
- 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](https://doi.org/10.1128/mSphere.00700-18) pmid: 30760616
- 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](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109720)
- 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](https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.01.032)
- 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/s11570-012-9744-y](https://doi.org/10.1007/s11570-012-9744-y)
- 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](https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.03.006) pmid: 22470054
- Gholami M, Mohammadi R, Arzanlou M, Akbari Dourbash F, Kouhshari 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](https://doi.org/10.1186/s12879-017-2513-7) pmid: 28583153
- 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](https://doi.org/10.1586/14787210.7.1.107) pmid: 19622060
- Kolaczowska A, Kolaczowski 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](https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2009.01722.x) pmid: 19549107
- 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.jmimet.2018.10.001](https://doi.org/10.1016/j.jmimet.2018.10.001) pmid: 30291881
- 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](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112017) pmid: 34391169
- 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](https://doi.org/10.1099/jmm.0.069609-0) pmid: 24913563