

## ارزیابی اثر ضد میکروبی اولئوروپین بر مخمرهای کاندیدا آلیکنس و کاندیدا گلابراتای مقاوم به فلوکونازول و باکتری اشیشیاکلی

محمدعلی اسفندیاری<sup>۱</sup>علیرضا خسروی<sup>۱\*</sup>سپیده اسدی<sup>۱</sup>دنیا نیک آیین<sup>۱</sup>جلال حسن<sup>۲</sup>

۱. گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی،

دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران،

تهران، ایران

۲. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه تهران، تهران، ایران

نویسنده مسئول:

علیرضا خسروی

تهران، خیابان آزادی، خیابان دکتر قریب،

دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

پست الکترونیک:

khosravi@ut.ac.ir

تعارض منافع: اعلام نشده است.

**زمینه و هدف:** عوارض جانبی مرتبط با داروهای ضد میکروبی و همچنین هزینه بالای آن‌ها، جست‌وجو برای ماده مؤثره گیاهان دارویی با قیمت مناسب و عوارض جانبی کمتر را برانگیخته است. از این مواد می‌توان به‌عنوان مکمل دارویی یا برای افزایش اثرات ضد میکروبی و ضدقارچی داروها استفاده کرد. هدف این مطالعه بررسی میزان اثر مهارکنندگی اولئوروپین بر عوامل بیماری‌زای قارچی و باکتریایی جدا شده از عفونت ناخن در شرایط آزمایشگاهی است.

**روش اجرا:** خواص ضدقارچی و ضدباکتریایی اولئوروپین با تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) و Minimum Bactericidal Concentration (MBC) و Minimum Fungicidal Concentration (MFC) این ماده، بر مخمرهای کاندیدا آلیکنس، کاندیدا گلابراتا و باکتری اشیشیاکلی با روش میکروبراث دایلوژن ارزیابی شد.

**یافته‌ها:** آزمایشات نشان دادند که حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) اولئوروپین علیه هر سه میکروارگانیسم مورد مطالعه برابر با ۶۵ و حداقل غلظت کشندگی (MBC/MFC) برابر با ۱۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به فعالیت ضدقارچی و ضدباکتریایی زیاد اولئوروپین، این مطالعه این ماده را به‌عنوان یک داروی مکمل ضد میکروبی طبیعی معرفی می‌کند. همچنین می‌توان از این ماده برای افزایش قدرت ضد میکروبی آنتی‌بیوتیک‌های موجود کمک گرفت.

**کلیدواژه‌ها:** اولئوروپین، ضد میکروبی، کاندیدا آلیکنس، کاندیدا گلابراتا، اشیشیاکلی

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۱۲/۱۴ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۱۲/۱۹

پوست و زیبایی؛ زمستان ۱۴۰۲، دوره ۱۴ (۴): ۱۹۹-۲۰۸

### مقدمه

انسان می‌داند. همچنین مقاومت گونه‌های مختلف کاندیدا به داروهای ضدقارچی با گذشت زمان افزایش یافته است، تا آنجایی که باعث ایجاد پیامدهایی از جمله عدم رضایت به درمان‌های مختلف و حتی مرگ شده است<sup>۱</sup>.

اشیشیاکلی یکی از مهم‌ترین باکتری‌هایی است که در فلور طبیعی روده یافت می‌شود و در سطح جهان مسئول شیوع بیماری‌های مختلف است<sup>۲</sup>. مطالعات مختلف افزایش روزافزون مقاومت این باکتری به

قارچ کاندیدا از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های قارچی در انسان و حیوان است. این عفونت‌ها در افراد با بیماری‌های زمینه‌ای رایج‌تر هستند. انواع این عفونت‌ها از کلینیزاسیون مخاطی تا عفونت‌های مهاجم و کشنده متغیر است. قارچ‌های کاندیدا آلیکنس و کاندیدا گلابراتا از شایع‌ترین عوامل این عفونت‌ها محسوب می‌شوند که از سطح بدن، پوست و ادرار قابل جداسازی هستند. این گونه‌ها را به‌عنوان یکی از عوامل فرصت‌طلب بیماری‌های قارچی سطحی و احشایی

داروهای ضد میکروبی را گزارش کرده‌اند.<sup>۳۴</sup> تجمع‌های بیوفیلم مانند اشیشیاکلی، این باکتری را از درمان آنتی‌بیوتیکی و سیستم ایمنی محافظت می‌کنند. همچنین آنها می‌توانند ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ برابر بیشتر از باکتری‌های پلانکتون در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت داشته باشند.<sup>۵</sup>

اونیکومایکوزیس نوعی از عفونت قارچی ناخن با شیوع روزافزون است.<sup>۶</sup> درمان اونیکومیکوزیس یک چالش مداوم است که اغلب به درمان چند ماهه نیاز دارد و خطر عود بالایی دارد؛ مخصوصاً اگر با عفونت‌های ثانویه همراه باشد. ۲۰ تا ۲۵ درصد بیماران به درمان پاسخ نمی‌دهند و ۱۰ تا ۵۰ درصد عود می‌کنند.<sup>۷</sup>

از منابع سرشار اولئوروپین، میوه زیتون می‌باشد که از حوزه دریای مدیترانه، شمال آفریقا، جنوب شرقی آسیا، شمال تا جنوب چین، اسکاتلند و شرق استرالیا پراکنده شده است. زیتون با نام علمی *Olea europaea* شامل تقریباً ۳۵ تا ۴۰ گونه از خانواده اولئاسه بوده و وجود اولئوروپین در میوه زیتون توسط Bourquelot و Vintilesco در سال ۱۹۰۸ شناخته شد. عمده خواص زیتون از جمله تلخی میوه زیتون به خاطر اولئوروپین می‌باشد. این ماده از جمله ترکیب‌های فنلی بسیار مهم و فراوان در میوه و برگ‌های زیتون می‌باشد. اولئوروپین از گروه خاصی از ترکیبات شبه کومارینی به نام سکویریدوئیدها است که به فراوانی در خانواده گیاهان Oleaceae، Gentianales، Cornales و بسیاری از گیاهان دیگر یافت می‌شود.

یریدوئیدها و سکویریدوئیدها ترکیباتی هستند که معمولاً با پیوند گلیکوزیدی به هم متصل می‌شوند. اولئوروپین یک استر ۲- (۳، ۴- دی‌هیدروکسی‌فنیل) اتانول (هیدروکسی تیروزول) است که اسکلت اولئوزیدی در گلوکوزیدهای سکویریدوئید Oleaceae مشترک دارد. اولئوروپین به مقدار ۶۰ تا ۹۰ میلی‌گرم در هر گرم از برگ خشک زیتون وجود دارد، اگرچه در سراسر درخت یافت شده است.<sup>۸،۹</sup>

محققین اولئوروپین را یک مکمل طبیعی، دارای فواید دارویی مهم از جمله در بالابردن انرژی بیماران و کمک به بهبود زونا، تبخال، سرماخوردگی، عفونت‌های قارچی، کوفتگی مزمن و ضدآلرژی می‌شناسند. طبق بررسی‌ها، ترکیب کلسیم النولات که از اولئوروپین مشتق شده است، بر اکثر میکروارگانیسم‌ها از جمله ویروس‌ها مؤثر است و آن‌ها را از بین می‌برد. همچنین در خنثی کردن آنزیم پروتئاز مفید است. محققان معتقدند که اولئوروپین از طریق تأثیر بر غشای باکتری‌ها، آن‌ها را غیرفعال می‌کند.<sup>۱۰</sup>

اولئوروپین دارای خواص ضد میکروبی، ضد اکسیدانی، ضد توموری، ضد التهابی است و همچنین از اندام‌های داخلی مانند کبد و سیستم عصبی محافظت می‌کند. اولئوروپین بیشتر به صورت پودر کریستالی جامد مورد استفاده قرار می‌گیرد که باید در حلال‌های آلی مانند اتانول، دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) و دی‌متیل‌فراماید (DMF) حل شود. حلالیت اولئوروپین در اتانول و دی‌متیل سولفوکساید تقریباً ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و در دی‌متیل فراماید تقریباً ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر است. رقت‌های بیشتری از محلول موجود در بافرهای آبی یا سالیان ایزوتونیک باید قبل از انجام آزمایشات بیولوژیکی ساخته شود. محلول اولئوروپین را می‌توان با حل مستقیم جامد کریستالی در بافرهای آبی تهیه کرد. حلالیت اولئوروپین در بافر فسفات با اسیدیته ۷/۲، تقریباً ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر است.<sup>۱۱</sup>

سالیان زیادی است که از گیاهان دارویی به منظور جایگزینی برای انواع داروها و ضد عفونی‌کننده‌های شیمیایی استفاده می‌گردد؛ لذا هدف از این مطالعه بررسی میزان تأثیر اولئوروپین بر کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتای مقاوم به فلوکونازول و نیز باکتری اشیشیاکلی جدا شده از عفونت ناخن بود.

## روش اجرا

## سویه‌های میکروبی

در این مطالعه از قارچ‌های کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا جدا شده از بیماران مبتلا به اونیکومایکوزیس و همچنین باکتری اشیریشیاکلی جدا شده از یک مورد عفونت ناخن میکس کاندیدیایی - باکتریایی با سابقه عود مکرر استفاده شده است. مخمرهای کاندیدا روی محیط سابورو دکستروز آگار (مرک، آلمان) و باکتری اشیریشیاکلی در محیط کشت مولر هینتون برات (مرک، آلمان) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت کشت داده شدند.

## تهیه اولئوروپین و دارو

فلوکونازول با خلوص ۹۸٪ (سیگما آلدریج، بریتانیا) استفاده شد. اولئوروپین با خلوص ۹۸٪ از گروه سم‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. اولئوروپین استفاده شده، از عصاره هیدروالکلی تهیه شده از برگ زیتون به روش استخراج مایع - مایع به دست آمد که به وسیله ستون کروماتوگرافی خالص سازی شد. سپس خلوص ترکیب با کمک استاندارد اولئوروپین توسط دستگاه HPLC به میزان ۹۸٪ تعیین گردید و ساختار ترکیب استخراج شده با استفاده از دستگاه NMR تایید شد.<sup>۹</sup>

## تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC/MFC)

در این مطالعه حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC) مخمر کاندیدا برای اولئوروپین و فلوکونازول با استفاده از روش میکروبراث دایلوژن مطابق با استاندارد CLSI M60-Ed1 تعیین شد.<sup>۱۲</sup> همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) باکتری اشیریشیاکلی برای اولئوروپین با استفاده از روش میکروبراث دایلوژن مطابق با استاندارد CLSI M100-Ed31 تعیین شده است.<sup>۱۳</sup>

همچنین برای تست حساسیت دارویی مخمر کاندیدا، رقت‌های دو برابر از ۰/۲ تا ۲۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اولئوروپین و ۰/۵ تا ۲۵۶ میکروگرم در میلی‌لیتر فلوکونازول در محیط RPMI-1640 (گیبوکو، برزیل) همراه با ۰/۱ درصد دی‌متیل‌سولفو کسید تهیه شد. همچنین برای آزمایش حساسیت دارویی باکتری اشیریشیاکلی از محیط کشت مولر هینتون برات (مرک، آلمان) استفاده شد. سوش‌های کاندیدا پاراپسیلوزیس با ATCC ۲۲۰۱۹ و کاندیدا کروزه‌ای با ATCC ۶۲۵۸ برای کنترل اعتبار روش تست حساسیت فلوکونازول بر اساس استاندارد CLSI M60 استفاده شد.

تعداد نهایی سوسپانسیون مخمر ( $10^3 \times 2/5 - 0/5$  CFU/ml) و سوسپانسیون باکتریایی ( $10^5 \times 5$  CFU/ml) با استفاده از لام هموسیتومتر تهیه شد. سپس آن‌ها به همه چاهک‌ها، به جز چاهکی که به عنوان کنترل منفی تعیین شده بود، در هر ردیف اضافه شدند. یک چاهک هم به عنوان کنترل مثبت تعیین شد که فقط حاوی محیط کشت و سوسپانسیون تلقیحی بود. پلیت‌ها کمی مخلوط شدند، سپس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. کمترین غلظت اولئوروپین در چاهکی که هیچ کدورتی در آن مشاهده نشد، به عنوان مقدار MIC در نظر گرفته شد.

برای تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC/MFC) مقدار ۱۰ میکرولیتر از چاهک‌هایی که رشد قابل مشاهده‌ای نداشتند، روی محیط کشت تریپتیک سوی برات (مرک، آلمان) و محیط کشت سابورو دکستروز آگار (مرک، آلمان) کشت داده شدند. حداقل غلظت کشندگی (MBC/MFC) به عنوان حداقل غلظت دارو در جایی تعریف شد که رشدی مشاهده نشده بود. همه آزمایشات سه مرتبه تکرار شدند.

## یافته‌ها

### تعیین MIC و MBC/MFC

نتایج آزمون حساسیت فلوکونازول برای قارچ‌ها نشان داد که هر دو مخمر کاندیدا آلبیکنس (با MIC برابر با ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و کاندیدا گلابراتا (با MIC برابر با ۶۴ میکروگرم در میلی‌لیتر) به فلوکونازول مقاوم بودند. نتایج آزمایش رقت‌سازی میکروبراث کاندیدا پاراپسیلوزیس با ATCC ۲۲۰۱۹ (با MIC برابر با ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر) و کاندیدا کروزه‌ای با ATCC ۶۲۵۸ (با MIC برابر با ۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر) اعتبار این تست را تأیید کرد. آزمایش‌ها سه‌بار تکرار شد و میانگین MIC و MBC/MFC ثبت شد.

نتایج حاصل از تست‌های میکروبراث دایلووشن اولئوروپین بر هر سه میکروارگانیسم مورد مطالعه در جدول ۱ آمده است که اعداد برابر با ۶۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و ۱۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حداقل غلظت کشندگی اولئوروپین را نشان می‌دهند. با در نظر گرفتن اینکه اگر نسبت اعداد MBC/MFC به MIC به دست آمده کمتر از ۴ باشد یک ماده کشنده میکروبی تعریف می‌شود<sup>۱۲</sup>، با توجه به نتایج این تحقیق ماده اولئوروپین را می‌توان یک ماده کشنده برای میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه معرفی کرد.

جدول ۱: حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی اولئوروپین و نسبت آن‌ها.

نام	حداقل غلظت مهارکنندگی (میکروگرم در میلی‌لیتر)	حداقل غلظت کشندگی (میکروگرم در میلی‌لیتر)	نسبت حداقل غلظت کشندگی به حداقل غلظت مهارکنندگی
کاندیدا آلبیکنس	±۰/۶۵	±۱۳۰	۲
کاندیدا گلابراتا	±۰/۶۵	±۱۳۰	۲
اشریشیاکلی	±۰/۶۵	±۱۳۰	۲

نتایج به صورت انحراف معیار ± میانگین آورده شده است.

## بحث

از جمله باکتری‌هایی که به دلیل افزایش مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها بیشترین تهدید را برای سلامتی انسان ایجاد می‌کنند، اعضای خانواده انتروباکتریاسه به‌ویژه باکتری اشریشیاکلی هستند. در میان مکانیسم‌های مختلف مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها، قوی‌ترین و متنوع‌ترین سیستم مربوط به باکتری اشریشیاکلی است<sup>۱۴</sup>. همچنین به‌طور کلی بروز عفونت‌های ناشی از گونه‌های کاندیدا به‌میزان قابل توجهی در طول دهه‌های گذشته افزایش یافته است که عمدتاً به دلیل افزایش اپیدمی ایدز، جمعیت فزاینده سالمند و افزایش بیماران نقص ایمنی می‌باشد. از طرفی جامعه بشری با مشکل حادتری به نام افزایش روزافزون مقاومت نسبت به داروهای ضدقارچی نیز روبرو است.

کاندیدا آلبیکنس عامل اصلی انواع عفونت‌های ناشی از کاندیدا محسوب می‌گردد و در ضمن به دلیل بروز همین مقاومت‌ها، شیوع انواع گونه‌های کاندیدای غیرآلبیکنس مخصوصاً گونه کاندیدا گلابراتا در طول سالیان گذشته جایگزین کاندیدا آلبیکنس شده‌اند. به‌علاوه وجود عوارض متعدد داروهای ضدقارچی نوظهور و همچنین هزینه‌های بالای آن‌ها، راه را برای استفاده از مواد دارویی گیاهی با عوارض و هزینه‌های پایین‌تر باز می‌کند تا از این مواد به‌عنوان کمک یا جایگزین داروهای موجود استفاده گردد<sup>۱۵،۱۶</sup>.

گیاهان دارویی از زمان‌های قدیم برای درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفته‌اند و از خواص ضد میکروبی آن‌ها به اشکال مختلف به‌عنوان نگهدارنده برای حفظ کیفیت غذا، افزایش ماندگاری و ضد عفونی کردن محیط استفاده شده است<sup>۱۷،۱۸</sup>.

به دلیل افزایش مقاومت میکروبی به داروهای رایج باید جایگزین‌های ایمن‌تر با عوارض جانبی کمتر در نظر گرفته شود<sup>۱۹</sup>. اولئوروپین موجود در روغن زیتون

کاندیدا دابلینسیس، به مقدار MIC برابر ۴۶/۸۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای کاندیدا آلبیکنس و MIC برابر با ۶۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای کاندیدا دابلینسیس دست یافت که نتایج حاصل از این تحقیق همسو با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد<sup>۲۸</sup>. Ghaffaripour و همکاران در سال ۲۰۱۹، به روش سریال دایلوژن اثر عصاره برگ زیتون بر کاندیدا آلبیکنس را بررسی و بیان کردند که اگرچه تمام غلظت‌های مساوی یا بیشتر از ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره با تعداد کلنی‌های کنترل مثبت تفاوت معنی‌داری داشتند؛ اما MIC و MFC، به ترتیب غلظت‌های ۸ و ۳۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر را نشان می‌دهند که در نهایت آن را به‌عنوان یک داروی مکمل مناسب در درمان کاندیدا معرفی کرده است<sup>۲۹</sup>.

Khan و همکاران در سال ۲۰۱۹ با مطالعه سه عصاره مختلف برگ زیتون (آبی، اتانولی و اتیل‌استات) از لحاظ ترکیبات فیتوشیمیایی، فعالیت‌های ضداکسیدانی و ضد میکروبی، مشاهده کردند که عصاره اتانولی دارای بالاترین محتوای آلکالوئیدها، فلاونوئیدها و فنل می‌باشد که این عامل باعث افزایش اثر عصاره اتانولی در برابر بیشتر باکتری‌های بیماری‌زا می‌شود. در حالی که عصاره‌های آبی و اتیل‌استاتی در برابر بیشتر سویه‌های قارچی (گونه‌های آسپرژیلوس، کاندیدا و فوزاریوم) قوی‌تر بودند<sup>۳۰</sup>.

مطالعاتی نیز اثر مهارتی اولئوروپین بر چندین میکروب بیماری‌زا از جمله کاندیدا آلبیکنس و اشریشیاکلی را سنجیده‌اند. Sahoury و همکاران در سال ۲۰۲۱ با مقایسه اثر مهارتی اولئوروپین و عصاره آویشن بر تعدادی از میکروب‌های پاتوژن از جمله کاندیدا آلبیکنس گزارش دادند که بهترین غلظت اولئوروپین موردنیاز ۰/۶ درصد می‌باشد. همچنین استفاده از این ترکیب را به‌عنوان نگهدارنده طبیعی ضد میکروبی در محصولات غذایی، آرایشی، بهداشتی، دارویی و درمان بیماری‌های عفونی مانند عفونت‌های

بکر، فراهمی زیستی بالایی دارد. این ترکیب خواص ضد اکسیدانی، ضد التهابی، ضد آتروژنیک، ضد سرطان، ضد میکروبی و ضد ویروسی دارد. این ماده به‌عنوان مکمل غذایی در کشورهای مدیترانه‌ای به‌صورت تجاری در دسترس است<sup>۲۰،۲۱</sup>.

نشان داده شده است که اولئوروپین تمایل ترکیبی بالایی برای چسبیدن به غشای پلاسمایی دارد<sup>۲۲</sup> و با تأثیرگذاری بر تعامل بین مولکولی بین اولئوروپین و فسفولیپیدهای آنیونی در غشاها، تأثیر منفی بر غشاهای فسفولیپیدی برادر دارد. این فعل و انفعالات می‌تواند منجر به تغییراتی در نفوذپذیری غشای سلولی شود که برخی از محققان آن را به ساختار ارتودیفنول اولئوروپین نسبت می‌دهند<sup>۲۳</sup>.

در این مطالعه، میزان MIC و MBC/MFC عوامل بیماری‌زای میکروبی جدا شده از عفونت ناخن در مجاورت با ماده اولئوروپین از طریق میکروبراث دایلوژن مطابق با استاندارد CLSI بررسی شد.

مطالعات محدودی روی اثر ضد میکروبی ماده اولئوروپین خالص در جهان انجام شده است و بیشتر مطالعات اثر ضد میکروبی عصاره برگ زیتون را سنجیده‌اند که نتایج این مطالعات اثر ضد میکروبی بالای این ماده را گزارش کرده‌اند<sup>۲۴-۲۶</sup>. نصراللهی و همکاران در سال ۲۰۱۵، اثر کلی عصاره برگ زیتون را روی کاندیدا آلبیکنس نشان داده‌اند. در این مطالعه فعالیت ضد قارچی این عصاره با اندازه‌گیری MIC و MFC، با استفاده از آزمون میکروبراث دایلوژن و روش دیسک دیفیوژن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. عصاره‌های آبی برگ زیتون دارای MIC برابر ۲۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و MFC برابر ۴۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و قطر ناحیه بازدارندگی ۲۱ میلی‌متر است. نتایج حاصل از این مطالعه حساسیت کاندیدا آلبیکنس مذکور به عصاره آبی برگ زیتون را نشان می‌دهد<sup>۲۷</sup>. Zoric و همکاران در سال ۲۰۱۶ با بررسی اثر مهارتی عصاره برگ زیتون بر کاندیدا آلبیکنس و

سطحی پوست ناشی از میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا بسیار امیدوارکننده دانستند.<sup>۳۱</sup>

در این مطالعه به بررسی فعالیت‌های ضد میکروبی اولئوروپین علیه کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا و اشیشیاکلی پرداخته شد. با توجه به استفاده روزافزون از فلوکونازول به‌عنوان درمان یا پیشگیری برای انواع بیماری‌ها، به‌ویژه سرطان خون، دریافت‌کنندگان پیوند مغز استخوان، نوزادان و حتی مبتلایان به ولوواژینیت کاندیدایی، شیوع گونه‌های کاندیدای مقاوم به فلوکونازول در سراسر جهان در حال افزایش است<sup>۳۲-۳۵</sup> بنابراین، سوبه‌های مورد استفاده در این مطالعه، گونه‌هایی بودند که مقاومت بالایی به فلوکونازول نشان دادند.

نتایج آزمون حساسیت فلوکونازول برای قارچ‌ها نشان داد که هر دو گونه کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا به فلوکونازول مقاوم هستند و مقدار MIC و MFC برای اولئوروپین به ترتیب برابر با ۶۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ۱۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. در حالی که بیشتر مطالعات روی اثر ضد میکروبی عصاره برگ زیتون متمرکز شده‌اند، مطالعاتی که به‌طور خاص بر اولئوروپین متمرکز شده باشند محدود هستند. در تحقیقات گذشته، اثر مهارتی اولئوروپین بر کاندیدا آلبیکنس با مقدار MIC برابر با ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر را نشان دادند و همچنین بیان کردند که این ماده فاکتورهای حدت ضروری عفونت قارچی را مورد هدف قرار می‌دهد.<sup>۳۶</sup>

Andrea Pirković و همکاران در سال ۲۰۲۳ با آزمایش اثر مهارتی اولئوروپین بر مخمر کاندیدا تروپیکالیس، میزان MIC را ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش کردند.<sup>۳۷</sup> در مطالعه دیگری، Dominciano و همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان دادند زمانی که اولئوروپین به‌تنهایی مورد استفاده قرار گرفت، فعالیت ضد میکروبی خفیفی در برابر سلول‌های پلانکتون استافیلوکوکوس اورئوس و اشیشیاکلی با MIC برابر با ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر داشت که نتایج این بررسی، با

نتایج مطالعه حاضر همسو نبود.<sup>۳۸</sup> Topuz و همکاران در سال ۲۰۲۲ نشان دادند که در بین میکروارگانیزم‌ها، استافیلوکوکوس اورئوس حساس‌ترین باکتری به عصاره اولئوروپین است، در حالی که باکتری اشیشیاکلی با طیفی از مقادیر MIC برابر با ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تا ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، مقاوم‌ترین آن‌ها بود.<sup>۳۹</sup>

Liu و همکاران در سال ۲۰۱۷ مشخص کردند که اولئوروپین، رشد لیستریا مونوسیتوژنز، اشیشیاکلی و سالمونلا انتریتیدیس را با غلظت ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به ترتیب با ۵۸، ۹۴ و ۳۶ درصد مهار می‌کند.<sup>۴۰</sup> در مطالعه دیگری، MIC عصاره برگ زیتون در برابر لیستریا مونوسیتوژنز، ۶۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تعیین شد در حالی که MIC اولئوروپین خالص ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود.<sup>۴۱</sup> لازم به ذکر است که تفاوت مشاهده‌شده در نتایج MIC این مطالعه و سایر مطالعات را می‌توان به دلیل تفاوت در روش استخراج، خالص‌سازی اولئوروپین و همچنین تفاوت در میزان مقاومت ذاتی یا اکتسابی جدایه‌های مورد مطالعه توضیح داد.

نتایج این مطالعات نشان می‌دهند که اولئوروپین خواص ضد میکروبی در برابر انواع مختلف باکتری‌ها و قارچ‌ها دارد. در این مطالعه اثر مهارکنندگی اولئوروپین بر مخمرهای کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا و باکتری اشیشیاکلی جدا شده از ناخن بررسی شد که نتایج نشان می‌دهند اولئوروپین خواص ضد میکروبی دارد بنابراین، این ماده را می‌توان به‌عنوان یک داروی مکمل ضد میکروبی با منشأ طبیعی معرفی کرد.

نتایج این مطالعه در شرایط برون تنی نشان داد که اولئوروپین خواص ضد قارچی و ضد باکتریایی بالایی دارد. این خواص می‌تواند از رشد قارچی و باکتریایی جلوگیری کرده و حتی آن‌ها را از بین ببرد. با توجه به این نتایج، اولئوروپین را می‌توان به‌عنوان یک داروی گیاهی ضد قارچ و ضد باکتری برای استفاده موضعی،

توصیه می‌گردد.

### تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران برای تأمین اعتبار موردنیاز این مطالعه تشکر و قدردانی کنند.

خوراکی و یک ضد عفونی‌کننده محیطی معرفی کرد. البته برای استفاده درمانی، مطالعات بیشتری در مورد عوارض احتمالی و سایر جنبه‌های ایمنی این ترکیب موردنیاز است.

برای مطالعات آتی، سنجش تأثیر اولئوروپین علیه دیگر میکروب‌های بیماری‌زا و همچنین بررسی این ماده روی تشکیل بیوفیلم میکروب‌های مهم و نیز میزان سمیت این ماده در مجاورت سلول‌های انسانی

### References

1. Anassie E, Mc Ginnis M, Pfaller M. *Clinical Mycology*. 2003. Churchill livingstone.
2. Fatima R, Aziz M. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). StatPearls [Internet]. 2020.
3. Bhardwaj DK, Taneja NK, Shivaprasad D, et al. Phenotypic and genotypic characterization of biofilm forming, antimicrobial resistant, pathogenic *Escherichia coli* isolated from Indian dairy and meat products. *Int J Food Microbiol* 2021; 336: 108899.
4. Karigoudar RM, Karigoudar MH, Wavare SM, et al. Detection of biofilm among uropathogenic *Escherichia coli* and its correlation with antibiotic resistance pattern. *J Lab Physic* 2019;11:17-22.
5. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35:322-32.
6. Bodman MA, Krishnamurthy K. Onychomycosis. StatPearls [Internet]: StatPearls Publishing; 2022.
7. Zaraa I, Dehavay F, Richert B. Onychomycosis. *Hand Surg Rehabil* 2024:101638.
8. Soler-Rivas C, Espín JC, Wichers HJ. Oleuropein and related compounds. *J Sci Food Agric* 2000; 80: 1013-23.
9. Khalil AA, Rahman MM, Rauf A, et al. Oleuropein: Chemistry, extraction techniques and nutraceutical perspectives-An update. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2023:1-22.
10. Lee-Huang S, Zhang L, Huang PL, et al. Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Mol Cell Biol Res Commun* 2003; 307: 1029-37.
11. Otero DM, Oliveira FM, Lorini A, et al. Oleuropein: Methods for extraction, purifying and applying. *Rev Ceres* 2020;67:315-29.
12. CLSI. Performance standards for antifungal susceptibility testing of fungi, M60, 1st ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA 2020.
13. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100, 31st ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA 2021.
14. Galindo-Méndez M. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *E. coli Infections-Importance of Early Diagnosis and Efficient Treatment* 2020: 1-20.
15. Denning DW. Antifungal drug resistance: An update. *Eur J Hosp Pharm* 2022;29:109-12.
16. Vitiello A, Ferrara F, Boccellino M, et al. Antifungal Drug Resistance: An emergent health threat. *Biomedicin* 2023;11:1063.

17. Jamshidi-Kia F, Lorigooini Z, Amini-Khoei H. Medicinal plants: Past history and future perspective. *J Herbmmed Pharmacol* 2017;7:1-7.
18. Vaou N, Stavropoulou E, Voidarou C, et al. Towards advances in medicinal plant antimicrobial activity: A review study on challenges and future perspectives. *Microorganisms* 2021;9:2041.
19. Nimer NA. Nosocomial infection and antibiotic-resistant threat in the middle east. *Infect Drug Resist* 2022:631-9.
20. Du GH, Zhang X, Du LD, et al. Oleuropein. *Natural Small Molecule Drugs from Plants*. 2018:713-7.
21. Rey AI, De Cara A, Segura JF, et al. Dietary oleuropein extract supplementation and its combination with  $\alpha$ -tocopheryl acetate and selenium modifies the free fatty acid profile of pork and improves its stability. *J Sci Food Agric* 2021;101:2337-44.
22. Caturla N, Pérez-Fons L, Estepa A, et al. Differential effects of oleuropein, a biophenol from *Olea europaea*, on anionic and zwitterionic phospholipid model membranes. *Chem Phys* 2005;137:2-17.
23. Caturla N, Estepa A, Micol V. The relationship between oleuropein antimicrobial activity and its effects on biological membranes. *Olives and olive oil in health and disease prevention: Elsevier* 2010. 1345-54.
24. El-Sohaimy SA, Mansour HM, Zeitoun A, et al. ANTIOXIDANT, ANTIMICROBIAL AND ANTI-INFLAMMATORY POTENTIAL OF OLIVE LEAVES. *ZJAR*. 2021;48(1):161-72.
25. Aissaoui Y, Boukhari Y. Antioxidant, antibacterial and antifungal effects of phenolic extracts of extra virgin olive oil from two western regions of algeria: A comparative study. *Phytotherapie* 2021; 19: 93-9.
26. Martín-García B, De Montijo-Prieto S, Jiménez-Valera M, et al. Comparative extraction of phenolic compounds from Olive leaves using a sonotrode and an ultrasonic bath and the evaluation of both antioxidant and antimicrobial activity. *Antioxidants* 2022;11: 558.
27. Nasrollahi Z, Abolhasannezhad M. Evaluation of the antifungal activity of Olive leaf aqueous extracts against *Candida albicans* PTCC-5027. *Curr Med Mycol* 2015;1:37.
28. Zorić N, Kopjar N, Kraljić K, et al. Olive leaf extract activity against *Candida albicans* and *C. dubliniensis*—the in vitro viability study. *Acta Pharmaceutica* 2016;66:411-31.
29. Ghaffaripour R, Samsamipour M, Eslamifard Z, et al. Inhibitory effect of hydroalcoholic extract of olive leaf (*Olea europaea*) on growth of *Candida albicans*. *Int J Biol Pharm Sci* 2019;28:1-8.
30. Khan H, Ahmad W, Hussain I, et al. Phytochemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of leaves of *Olea europaea* wild variety. *J Food Meas Charact* 2020; 14: 640-8.
31. Sahoury Y, Naseef H, Farraj M, et al. Antimicrobial activity of oleuropein and thyme extracts against selected pathogenic microorganisms and their potential uses as natural preservatives. *Int J Pharm Res* 2021; 13: 1088-98.
32. Van Burik J, Leisenring W, Myerson D, et al. The effect of prophylactic fluconazole on the clinical spectrum of fungal diseases in bone marrow transplant recipients with special attention to hepatic candidiasis. An autopsy study of 355 patients. *Medicine* 1998; 77: 246-54.
33. Long SS, Stevenson DK. Reducing *Candida* infections during neonatal intensive care: management choices, infection control, and fluconazole prophylaxis. *J Pediatr* 2005;147:135-41.



34. Story K, Sobel R. Fluconazole prophylaxis in prevention of symptomatic candida vaginitis. *Curr Infect Dis Rep* 2020;22:1-4.
35. Berkow EL, Lockhart SR. Fluconazole resistance in *Candida* species: A current perspective. *Infect Drug Resist* 2017;237-45.
36. Zorić N, Kopjar N, Bobnjarić I, et al. Antifungal activity of oleuropein against *Candida albicans*-the in vitro study. *Mol* 2016;21:1631.
37. Bayram M, Topuz S, Karabıyıklı S, et al. Isolation of oleuropein from olive leaf by effective method and investigation of its antimicrobial properties. *Indian J Tradit Knowl* 2022;21:215-223.
38. Dominciano LC, Lee SH, Santello JM, et al. Effect of oleuropein and peracetic acid on suspended cells and mono-species biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Integr Food Nutr Metab* 2016;3:314-7.
39. Topuz S, Bayram M. Oleuropein extraction from leaves of three olive varieties (*Olea europaea* L.): Antioxidant and antimicrobial properties of purified oleuropein and oleuropein extracts. *J Food Process Preserv* 2022; 46: e15697.
40. Liu Y, McKeever LC, Malik NS. Assessment of the antimicrobial activity of olive leaf extract against foodborne bacterial pathogens. *Front Microbiol* 2017; 8: 113.
41. Liu Y, McKeever LC, Suo Y, et al. Antimicrobial activities of olive leaf extract and its potential use in food industry. *Natural and Bio-Based Antimicrobials for Food Applications: Am Chem Soc* 2018; 119-32.

# Evaluation of the antimicrobial effect of oleuropein on *Candida albicans* and *Candida glabrata* isolates resistant to fluconazole and *Escherichia coli*

Mohammadali Esfandiary<sup>1</sup>  
Alireza Khosravi, PhD<sup>1\*</sup>  
Sepideh Asadi, PhD<sup>1</sup>  
Donya Nikaein, PhD<sup>1</sup>  
Jalal Hassan, PhD<sup>2</sup>

1. Department of Microbiology and Immunology, School of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
2. Department of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: Mar 04, 2024  
Accepted: Mar 09, 2024  
Pages: 199-208

**Corresponding Author:**  
Alireza Khosravi, PhD

School of Veterinary Medicine, Qarib St.,  
Azadi St., University of Tehran, Tehran,  
Iran  
Email: khosravi@ut.ac.ir

**Conflict of interest:** None to declare

**Background and Aim:** Side effects associated with antimicrobial drugs, as well as their high cost, have stimulated the search for inexpensive herbal medicinals with fewer side effects. These substances can be used as a medicinal supplement or to increase the antimicrobial and antifungal effects of drugs. The aim of this study is to investigate the inhibitory effect of oleuropein on fungal and bacterial pathogens isolated from nail infection in laboratory condition.

**Methods:** Antifungal and antibacterial properties of oleuropein by determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) of this substance on yeasts *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Escherichia coli* by microbroth dilution method using CLSI protocols were evaluated.

**Results:** The results showed that the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against all three studied microorganisms was equal to 65 mg/ml and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) of oleuropein was equal to 130 mg/ml.

**Conclusion:** due to the high antifungal and antibacterial activity of oleuropein, the present study introduces oleuropein as a natural antimicrobial drug. This substance can also be used to increase the antimicrobial power of existing antibiotics.

**Keywords:** oleuropein, antimicrobial, candida albicans, candida glabrata, escherichia coli

