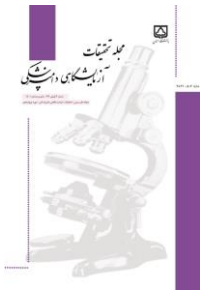


Journal of Veterinary Medicine & Laboratory 15(2023) 97-107

In vitro activity of some native Iranian plants in Prototheca isolated from Clinical Bovine Mastitis

Abbasi Sani, B.[1], Eidi, S. [2*], Ghodrati Azadi, H.[3].
Received: 24.03.2023 Accepted: 12.09.2023

Abstract

This study aimed to investigate of in vitro susceptibility of prototheca isolated from bovine clinical mastitis to some herbal extracts and chemical antifungal drugs amphotericin B and nystatin. Pure cultures of 20 isolates of *Prototheca zopfii* and 10 isolates of *Prototheca wickerhamii* isolated from bovine clinical mastitis after performing specialized microbiological tests to confirm them, were cultured on sabouraud dextrose agar culture medium supplemented with chloramphenicol (SC). algal suspensions including 1 × 106 spores in sterile 0.85% saline were prepared. Then, the antialgal activity of *Allium cepal*, *Apium graveolens*, *Ficus carica Actinidia deliciosa* extracts and *Ferula galbaniflua boiss. et buhse*essential oil was evaluated by the agar diffusion method. In the agar *disk* diffusion test, amphotericin B and nystatin were used as a positive control, and dimethyl sulfoxide was used as a negative control. The results showed that at the concentration of 200 mg/ml of *Actinidia deliciosa*, only 5 isolates of *P. zopfii* had inhibition zone diameter in the range of 7- 8 mm; While the isolates of both species of prototheca showed resistance to other extracts and *Ferula galbaniflua boiss. et abuse* essential oil. It seems that *Actinidia deliciosa* extract has more inhibitory power against prototheca isolates due to its lower pH than other extracts. Despite the resistance of prototheca isolates to plants tested in the present study, there are still problems in the field of treatment of protothecosis, especially prototheca mastitis, using conventional chemical antifungal drugs, and therefore it is suggested to continue the research on the therapeutic uses of natural and herbal products.

Keywords: *Prototheca zopfii*, *Prototheca wickerhamii*, mastitis, cattle, natural herbs.

---

1. DVM Graduated, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
2. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
3. Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
[*]**Corresponding author**: eidi@um.ac.ir.

فعالیت برون تنی برخی از گیاهان بومی ایران بر روی پروتوتکاهای جدا شده از ورم پستان بالینی گاو

عباسی ثانی، ب.[۱]، عیدی، س.[*۲]، قدرتی آزادی، ح.[۳]

دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۰۴ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۱

خلاصه

هدف از این مطالعه، بررسی حساسیت جدایه های پروتوتکاهای جدا شده از ورم پستان بالینی گاو نسبت به برخی از عصاره های گیاهی و داروهای ضد قارچی شیمیایی آمفوتریسین ب و نیستاتین در شرایط آزمایشگاهی بود. کشت های خالص از ۲۰ جدایه *پروتوتکا زوپفی* و ۱۰ جدایه *پروتوتکا ویکرهامی* جدا شده از پستان گاوهای مبتلا به ورم پستان پس از انجام آزمایش‌های تخصصی میکروبیولوژیک برای تایید آنها بر روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل (SC) کشت داده شد. سوسپانسیونی از جلبک ها با کدورتی معادل ۱×۱۰^{۶} اسپور در هر میلی لیتر سالین ۰/۸۵ درصد استریل تهیه شد. سپس با روش انتشار در آگار فعالیت ضد جلبکی عصاره‌های گیاهی پیاز،کرفس، انجیر و کیوی و اسانس باریچه مورد ارزیابی قرار گرفت. از دیسک حاوی داروهای آمفوتریسین ب و نیستاتین به عنوان کنترل مثبت و دیسک حاوی دی متیل سولفوکساید به عنوان کنترل منفی استفاده شد. نتایج نشان داد که تنها کیوی در غلظت ۲۰۰ میلی گرم /میلی لیتر، قطر مهاری در دامنه ۷ تا ۸ میلی متر در ۵ جدایه *پروتوتکا زوپفی* داشت؛ در حالیکه جدایه های هر دو گونه از پروتوتکا *به* سایر عصاره ها و اسانس باریچه مقاومت نشان دادند. به نظر می‌رسد که عصاره کیوی به دلیل pH کمتر نسبت به سایر عصاره‌ها از قدرت مهارکنندگی بیشتر در مقابل جدایه‌های پروتوتکا برخوردار است. با وجود مقاومت جدایه های پروتوتکا نسبت به گیاهان دارویی در مطالعه حاضر، همچنان مشکلات در زمینه درمان پروتوتکوزیس به خصوص ورم پستان پروتوتکایی با استفاده از داروهای ضد قارچ شیمیایی متعارف وجود دارد و بنابراین پیشنهاد می شود که تحقیقات بر روی استفاده های درمانی ناشی از محصولات طبیعی و گیاهی ادامه یابد.

واژه‌های کلیدی: *پروتوتکا زوپفی*، *پروتوتکا ویکرهامی*، ورم پستان، گاو، گیاهان طبیعی .

---

۱. دانش آموخته دکترای عمومی دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۲. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۳. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

*نویسنده مسئول: eidi@um.ac.ir

مقدمه

جلبک ها، ارگانیسمهایی یوکاریوت و ساپروفیت هستند که به شکل گسترده ای در محیط و بخصوص در آب وهمینطور در روده حیوانات حضور دارند (Kano، ۲۰۲۰). جلبک های بیرنگ و یوکاریوت متعلق به جنس پروتوتکا، موجوداتی تک سلولی، بیضی یا کروی شکل با قطر ۷ تا ۱۶ میکرومتر هستند که در شاخه کلروفیتا، رده تریبوکسی اوفیسیه، راسته کلرال و خانواده کلرلاسه طبقه بندی می‌شوند و توانایی فتوسنتز خود را از دست داده اند. اگرچه در حال حاضر رخداد پروتوتکوزیس غیرمعمول است، اما تشخیص موارد بیماری در انسان و حیوان در سراسر جهان رو به افزایش است؛ بطوریکه آنها می توانند به بافتها هجوم برده، و باعث ایجاد پروتوتکوزیس انسانی در بافت هایی چون پوست، ناخن، دستگاه تنفس و سیستم گوارشی و همینطور در حیوانات، بصورت پروتوتکوزیس پوستی در گربه، و منتشر در سگ و ورم پستان در گاو شوند (Kano، ۲۰۲۰).

جنس پروتوتکا دارای گونه های متعددی می باشد که ۷ گونه از آن شامل *پروتوتکا زوپفی* (*Prototheca zopfii*)، *پروتوتکا ویکرهامی* (*P. wikerhamii*)، *پروتوتکا بلاشکی* (*P. blaschkeae*)، *پروتوتکا بویس* (*P. bovis*) ، *پروتوتکا کوتیس* (*P. cutis*)، *پروتوتکا میاجی* (*P. miyajii*) و *پروتوتکا سیفری* (*P. ciferrii*) جزو پاتوژن های فرصت طلب می باشند (Jagielski و همکاران، ۲۰۱۹ و۲۰۲۲ ؛ Nardoni و همکاران، ۲۰۲۳) که می توانند در انسان و حیوانات بیماریزا باشند بطوریکه بعضی از این گونه های پاتوژن مسبب ورم پستان در گاوهای شیری هستند که از نشانه‌های بارز درگیری پستان‌ها با پروتوتکا، کاهش تولید شیر، افزایش حجم کارتیه‌های درگیر، ترشحات آبکی همراه با لخته و عدم پاسخ به درمان‌های روتین بوده (Corbellini و همکاران، ۲۰۰۱) و تا به امروز، تنها راه کنترل آن، حذف حیوانات مبتلا می باشد (Cuc و همکاران، ۲۰۱۰). افزایش تعداد عفونت های ناشی از این جلبک، بخصوص در میزبانان با کاهش ایمنی، و ایجاد مقاومت به عوامل ضد قارچی علاقه قابل توجه علمی و تجاری برای کشف ترکیبات جدید ضد قارچی را فراهم کرده است. گیاهان به دلیل داشتن محتوای زیاد ترکیبات فعالی مثل پلی فنل ها، کاتکین ها، ایزوفلاون هایی مانند جنیستینو گلیکوزیدهای دیادزینی منابع خوبی از مولکول های جدید ضد میکروبی هستند (Romani و همکاران، ۲۰۰۳؛ Cuc و همکاران، ۲۰۱۰). هدف از مطالعه حاضر، بررسی حساسیت جدایه های *پروتوتکا زوپفی* و *پروتوتکا ویکرهامی* جدا شده از موارد ورم پستان گاو نسبت به برخی از عصاره های گیاهی و داروهای ضد قارچی شیمیایی آمفوتریسین ب و نیستاتین در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش کار

تهیه ارگانیسم های مورد آزمایش:

۲۰ جدایه *پروتوتکا زوپفی* و ۱۰ جدایه *پروتوتکا ویکرهامی* از پستان گاوهای مبتلا به ورم پستان جمع آوری شد. آزمایش‌های تخصصی میکروبیولوژیک برای تایید ارگانیسم های مورد آزمایش انجام گردید. کشت های خالص از جدایه ها بر روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار حاوی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل (SC) کشت داده شد و تا زمان مطالعه در دمای۴ درجه سانتیگراد یخچال نگهداری شد.

جمع آوری مواد گیاهی:

مواد گیاهی شامل کیوی (*Actinidia deliciosa*)، کرفس (*Apium graveolens*)، انجیر (*Ficus carica*)، پیاز (*Allium cepal*) از بخش تحقیقات و فارماگنوزی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد و اسانس باریچه (کما) (*Ferula galbaniflua boiss. et buhse*) بصورت آماده از شرکت کیمیاگران راز طبیعت خریداری شد.

نیز شیر دریافت می کردند (جدول ۱). تجویز اسانس آویشن شیرازی به صورت تزریق عضلانی درناحیه شانه در ۲ سطح ۱۰۰و ۲۰۰میلی‌گرم درکیلوگرم وزن بدن گوساله به صورت تک دز در بدو تولد صورت گرفت.

عصاره گیری از پیاز و کیوی:

کیوی و پیاز با آب مقطر استریل تمیز شسته و به مدت یک ساعت در هوای آزاد خشک شدند. پوسته های خارجی پیاز و همینطور پوست کیوی جدا شده و هر کدام به قطعات کوچکتری برش داده شدند. عصاره گیری به روش ماسراسیون یا خیساندن انجام گرفت. بدین منظور، پیاز و

کیوی خشک شده را داخل مخلوط کن ریخته و سپس به ازای هر ۱۰۰گرم وزن پیاز و کیوی، در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت خیسانده شدند. خمیر بدست آمده درون یک ظرف شیشه ای استریل تیره رنگ و تمیز قرار داده و شدیدا" تکان داده شدند تا عصاره مناسب و یکدستی بدست آید. با استفاده از پارچه نخی استریلی فیلتر شدند و عصاره بدست آمده با دور g ×۳۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس به منظور خشک شدن عصاره های شفاف گیاهی، آنها را در داخل انکوباتور قرار داده که حاصل آن ماده ژل مانند جامد و قهوه‌ای رنگی بود که وزن شده و برای مراحل بعدی آزمایش به فریزر منتقل شدند.

عصاره گیری از کرفس و انجیر:

ابتدا کرفس و انجیر را با آب مقطر استریل تمیز شسته و خرد کرده و به مدت چند روز در هوای آزاد خشک شدند. عصاره گیری به روش سوکسله انجام گرفت. بدین منظور، ابتدا ۱۰۰ گرم از هر یک از گیاهان خشک شده به صورت پودر یکدستی آسیاب شدند؛ سپس هر کدام از آنها در داخل یک کاغذ استوانه‌ای شکل ریخته شده و به همراه ۵۰۰ میلی لیتر الکل ۷۰٪ به مدت ۴۸ ساعت در داخل دستگاه سوکسله قرار گرفتند. سپس با استفاده از دستگاه حذف حلال (Rotary Evaporator)، حلال موجود در عصاره ها حذف شدند و بدین ترتیب عصاره های غلیظی به دست آمد که به منظور خشک شدن به مدت چند روز در داخل انکوباتور قرار گرفتند. حاصل آن ماده ژل مانند جامد و قهوه‌ای رنگی بود که وزن شده و برای مراحل بعدی آزمایش به فریزر منتقل شدند.

اسانس باریچه:

بصورت آماده از شرکت کیمیاگران راز طبیعت خریداری شد.

آماده سازی سوسپانسیون جلبک:

سوسپانسیون‌های جلبک با کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند (تقریبا" معادل ۱×۱۰^{۶} اسپور در هر میلی لیتر سالین ۰/۸۵ درصد استریل برای شمارش با لام هموسیتومتردر زیر میکروسکوپ) تهیه شدند. برای اجتناب از به هم چسبیدن اسپورهای قارچی، حجم کمی از توئین ۸۰ به داخل سوسپانسیون‌ها اضافه گردید.

روش انتشار در آگار:

اصول کار با روش انتشار دیسک بر اساس دستورالعمل استاندارد NCCLS برای مخمرها انجام پذیرفت (NCCLS، ۲۰۰۲). روش انتشار در آگار برای ارزیابی فعالیت ضد جلبکی عصاره‌های گیاهی پیاز، کرفس، انجیر، کیوی و اسانس باریچه با غلظت‌های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ و ۲۵ میلی گرم/ میلی لیتر به کار برده شد. عصاره های گیاهی در دی متیل سولفوکساید ۱۰٪ (DMSO) حل شدند و قبل از تست برای فعالیت ضد جلبکی، این عصاره ها و همین طور داروهای ضد قارچ شیمیایی با عبور از یک فیلتر ۰/۲۲ میلی پورGV استریلیزه گردیدند. پس از آن، ابتدا سطح پلیت ها با ۰/۱میلی لیتر از سوسپانسیون جلبک تهیه شده با کمک یک سوآب پنبه ای استریل به طور یکنواخت بر روی محیط SC تلقیح شدند. سپس دیسک‌های کاغذی فیلتری به قطر ۶ میلی متر با غلظت های مختلف از اسانس و عصاره ها آغشته شدند. از دیسک حاوی داروهای ضد قارچ شیمیایی شامل آمفوتریسین ب با غلظت ۲/۵ میلی گرم /میلی لیتر و نیستاتین با غلظت ۵۰ میلی گرم/ میلی لیتر به عنوان کنترل مثبت و دیسک حاویDMSO به عنوان کنترل منفی استفاده شد. سپس پلیت ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای $۳۷^{o}C$ در انکوباتور قرار داده شد و بعد از گذشت ۳-۷ روز قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر اندازه گیری گردید. در انتها کلیه آزمایش ها سه بار تکرار شد و میانگین نتایج ثبت گردید.

روش آنالیز آماری:

جهت آنالیز آماری و مقایسه دو به دو گروه‌ها از آزمون توکی و دانکن در نرم افزار SPSS استفاده شد. سطح معناداری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد .($p<0.05$)

نتایج:

نتایج حاصل از اثر گیاهان دارویی و داروهای ضد قارچ شیمیایی بر روی جدایه های *پروتوتکا زوپفی* نشان داد که کیوی در غلظت ۲۰۰ میلی گرم /میلی لیتر، قطر مهاری در دامنه ۷ تا ۸ میلی متر در ۵ جدایه (۲۵٪) داشت. جدایه های این گونه از پروتوتکا به سایر عصاره ها و اسانس باریچه مقاومت نشان دادند؛ در حالیکه، نیستاتین و آمفوتریسین ب به ترتیب قطر مهاری در دامنه های ۸ – ۱۴ میلی متر و ۱۲– ۱۶ میلی متر نشان دادند (جدول ۱ و تصویر ۱). همچنین، تمام غلظت های اسانس و عصاره های گیاهی

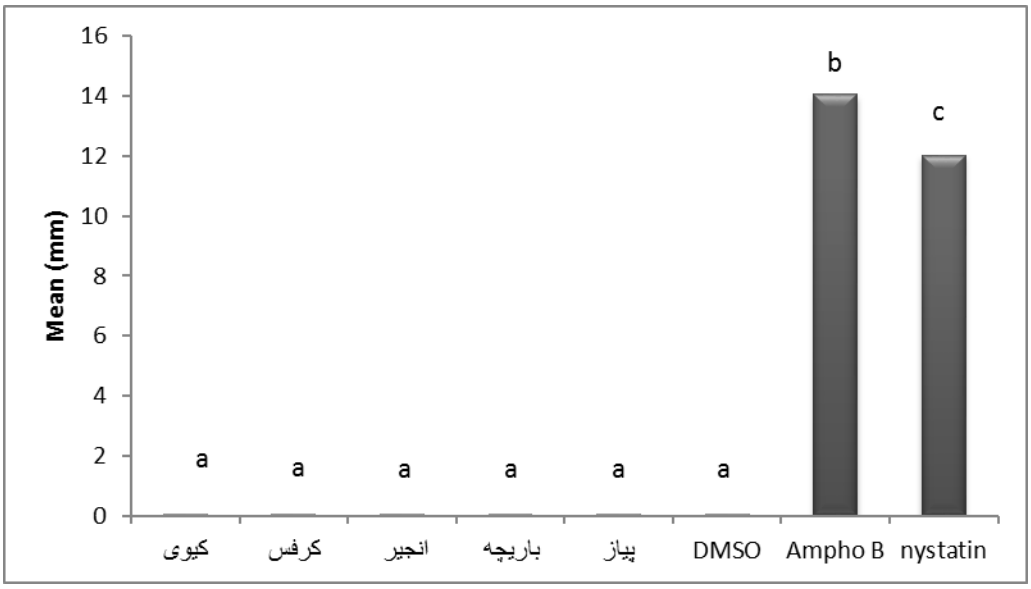
مورد مطالعه با آمفوتریسین ب و نیستاتین تفاوت معنی دار داشتند ($p<0.001$). (جدول ۱ و تصویر ۱)

نتایج حاصل از اثر گیاهان دارویی و داروهای ضد قارچ شیمیایی بر روی جدایه های *پروتوتکا ویکرهامی* نشان داد که جدایه های مورد بررسی از این گونه به تمام اسانس و عصاره های گیاهی مقاومت داشتند؛ در حالیکه نیستاتین و آمفوتریسین ب با قطر مهاری هر کدام در دامنه های ۱۲ – ۱۶میلی متر را نشان دادند (جدول ۱ و تصویر ۲). همچنین، تمام غلظت های اسانس و عصاره های گیاهی مورد مطالعه با آمفوتریسین ب و نیستاتین تفاوت معنی دار داشتند ($p<0.001$). (جدول ۱ و تصویر ۲)

جدول ۱– مقادیر حاصل از اثر مهاری اسانس و عصاره های گیاهی، DMSO و داروهای ضد قارچ شیمیایی در جدایه های *پروتوتکا زوپفی* (N = 20) و *پروتوتکا ویکرهامی* (N = 10)

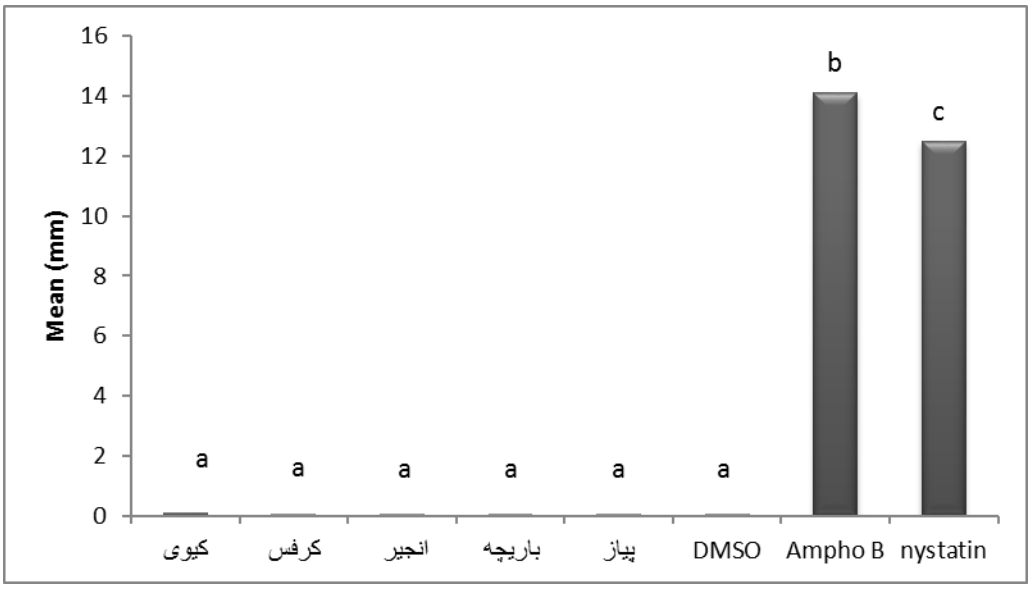
nystatin	Ampho B	DMSO	Allium cepal	Ferula galbaniflua	Ficus carica	Apium graveolens	Actinidia deliciosa	Isolate
12.025±1.509c	14.05±1.432b	0.026±0.063a	0.023±0.057a	0.023±0.07a	0.01±0.031a	0.015±0.049a	0.025±0.079 a	P. zopfii
12.5±1.269c	14.1±1.792b	0.037±0.078a	0.03±0.095a	0.029±0.061a	0.025±0.054a	0.025±0.054a	0.09±0.191a	P.wickerhamii

* داده ها به صورت Mean±SEM و حروف غیر متشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار است ($P<0/05$).



تصویر۱ : مقایسه اثر مهاری غلظت های مختلف اسانس و عصاره های گیاهی، DMSO و داروهای ضد قارچ شیمیایی بر روی جدایه های *پروتوتکا زوپفی* (N = 20)

*حروف غیر متشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار است (P<0/05).



تصویر۲ : مقایسه اثر مهاری غلظت های مختلف اسانس و عصاره های گیاهی، DMSO (کنترل منفی) و داروهای ضد قارچ شیمیایی (کنترل های مثبت) بر روی جدایه های *پروتوتکا ویکرهامی* (N = 10)

*حروف غیر متشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار است (P<0/05).

بحث

جدایه‌های پروتوتکا از زخم‌های پوستی، خلط و مدفوع انسان و انواع حیوانات اهلی، خانگی و وحشی جدا شدند. در حیوانات، *پروتوتکا زوپفی* و به ندرت *پروتوتکا ویکرهامی* به عنوان عوامل ایجاد کننده پروتوتکوزیس پوستی در سگها و گربه‌ها و ورم پستان در گاوهای شیری گزارش شده است (Corbellini و همکاران، ۲۰۰۱؛ Milanov و Suvajdzic، ۲۰۰۶؛Stenner و همکاران، ۲۰۰۷). تا به حال پروتکل دارویی موثری برای درمان این عفونت نادر در پزشکی و دامپزشکی تدوین نشده است. در عین حال، آمفوتریسین ب برای درمان پروتوتکوزیس منتشر استفاده می‌شود. به دلیل عوارض خطرناک و نامطلوب داروهای شیمیایی که بعضی مواقع از خود بیماری نیز خطرناک تر هستند و همین طور مقاومت به آن ها سبب شده است تا بررسی های زیادی در زمینه اثرات ضد میکروبی گیاهان دارویی صورت گیرد. گیاهان دارویی به مراتب ارزان تر بوده و منابع خوبی از لحاظ مولکول های جدید ضد میکروبی هستند. بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات ضد جلبکی گیاهان دارویی بر روی جدایه های *پروتوتکا زوپفی* و *پروتوتکا ویکرهامی* جدا شده از موارد ورم پستان گاو صورت گرفت.

نتایج بررسی عصاره‌های گیاهی کرفس، پیاز، انجیر و اسانس باریچه نشان داد که جدایه‌های پروتوتکای مورد بررسی به آنها مقاوم بودند. درحالی که هاله عدم رشد حاصل از عصاره‌ی کیوی با میانگین 7 میلی متر تنها در تعداد اندکی از جدایه‌های مورد بررسی مشاهده گردید (۱۶٪/۶۶). همچنین هاله عدم رشد با استفاده از نیستاتین در محدوده 15-8 میلی متر و آمفوتریسین ب در محدوده 16-11 میلی متر بدست آمد. مقاومت جدایه های پروتوتکا به گیاهان مورد بررسی در این مطالعه می تواند ناشی از چسبندگی احتمالی دیسک آغشته به اسانس و عصاره های گیاهی و همین طور عدم آزاد سازی غلظت های مورد استفاده برای اسانس و عصاره ها در محیط کشت باشد. وجود حساسیت عصاره کیوی به تعدادی از *پروتوتکا زوپفی* را می توان به دلیل PH کمتر آن نسبت به سایر عصاره های گیاهان مورد مطالعه مرتبط دانست.

در مطالعه Tortorano و همکارانش در سال ۲۰۰۸ در ایتالیا مشخص شد که جدایه‌های پروتوتکا به وریکونازول، کاسپوفونجین و ایتراکونازول مقاوم بودند در حالی که به آمفوتریسین ب، روغن درخت چای و روغن ترنج با حداقل غلظت مهاری (MIC) به ترتیب در محدوده های ۰/۵–۲۵ ۰/۰ میلی گرم/لیتر ، ۰/۱۲– ۰/۰۳ ٪ و ۵– ۰/۱۵ ٪ حساسیت نشان دادند. مقاومت پروتوتکاها به کاسپوفونجین به دلیل فقدان D–گلوکان، هدف اصلی اکینوکاندین ها، در دیواره سلولی و حساسیت این جلبک ها به داروهای آزولی و پلین ها به خاطر حضور ارگوسترول در قطعه لیپیدی غشاء سلولی آنها می باشد. نتایج حاصل از این مطالعه با مطالعه حاضر نشان می‌دهد که آمفوتریسین ب، اثر بازدارندگی بیشتری بر روی پروتوتکاهای مطالعه ما داشته است که این تفاوت می تواند ناشی از جدایه‌های بومی پروتوتکاهای مورد استفاده در هر مطالعه باشد (Tortorano و همکاران، ۲۰۰۸). در مطالعه‌ای که Bouari و همکارانش در سال ۲۰۱۴ در رومانی، اثر عصاره‌های گیاهی مختلف را بر روی ۱۰جدایه *پروتوتکا زوپفی* و ۱جدایه استاندارد *پروتوتکا ویکرهامی* بررسی کردند، نشان دادند که جدایه‌های *پروتوتکا زوپفی* به عصاره‌های صنوبر، پونه کوهی و دانه انگور مقام بودند در حالیکه نسبت به عصاره‌های مرزه، نعناع، درخت چای و ایتراکونازول با میانگین قطر هاله مهاری به ترتیب ۲۱، ۲۸، ۳۰ و ۲۰ میلی متر حساسیت نشان دادند. جدایه استاندارد *پروتوتکا ویکرهامی* به تمام عصاره‌های مذکور حساسیت نشان داد؛ به طوریکه میانگین قطر هاله مهاری برای این جدایه توسط عصاره ی صنوبر ۲۰ میلی متر، مرزه ۲۴ میلی متر، نعناع ۳۰ میلی متر، درخت چای ۳۲ میلی متر، دانه انگور ۲۰ میلی متر، پونه کوهی ۱۸ میلی متر و ایتراکونازول ۲۸ میلی متر بود (Bouari و همکاران، ۲۰۱۴). همچنین در مطالعه‌ای که Jagielski و همکارانش در سال ۲۰۱۲ در لهستان بر روی ۱۱۳ نمونه *پروتوتکا زوپفی* و ۳۱ *پروتوتکا بلاشکی* جمع آوری شده از کشورهای بلژیک، فرانسه، ایتالیا و لهستان انجام دادند، نشان دادند که از ۱۰ داروی ضد قارچ شیمیایی شامل آمفوتریسین ب، فلوسایتوزین، فلوکونازول، ایتراکونازول، وریکونازول، کتوکونازول، پساکونازول، کاسپوفونجین، آنیدولافونجین و میکافونجین، جدایه‌های *پروتوتکا زوپفی* به آمفوتریسین ب حساس تر بودند. همچنین بیشترین اثرگذاری در مصرف همزمان ۲ دارو باهم بین آمفوتریسین ب و ایتراکونازول، آمفوترسین ب و کتوکونازول و همین طور آمفوتریسین ب و وریکونازول مشاهده شد. حداقل

غظت مهاری آمفوتریسین ب ۱/۵ میلی گرم/لیتر و حداقل غلظت مهاری ایتراکونازول،کتوکونازول، وریکونازول و ایتراکونازول ۳۲< میلی گرم /لیتر مشاهده گردید (Jagielski و همکاران،۲۰۱۲).

در مطالعه‌ای که Wawron و همکارانش در سال ۲۰۱۳ در لهستان، اثر داروهای ضد قارچی را بر روی ۲۷ جدایه *پروتوتکا زوپفی* جدا شده از شیرهای آلوده به ورم پستان انجام دادند، مشاهده کردند که ۱۰۰٪ جدایه‌ها به کلوتریمازول، فلوکونازول، فلوسایتوزین و ۹۲/۶٪ از جدایه‌ها به میکونازول مقاوم بودند؛ درحالیکه به ترتیب نیستاتین(۸۸/۹٪)، آمفوتریسین ب (۴۸/۱٪) و کتوکونازول (۲۲٪/۲) بیشترین اثربخشی را نشان دادند (Wawronو همکاران،۲۰۱۳). در مطالعه Grzesiak و همکارانش در سال ۲۰۱۶ در لهستان، به بررسی اثرمهاری داروهای ضد قارچی شیمیایی و گیاهان دارچین، آویشن، ریحان، اسطوخودوس و رزماری بر روی *پروتوتکا زوپفی* پرداختند و نشان دادند که تنها نیستاتسن اثر مهارکنندگی بر روی جدایه‌های *پروتوتکا زوپفی* داشت و ۱۰۰ ٪ جدایه ها به آمفوتریسیسن ب، کلوتریمازول، میکونازول، کتوکونازول، فلوکونازول و فلوسایتوزین مقاوم بودند. همچنین از میان گیاهان دارویی مورد استفاده نیز دارچین دارای بیشترین اثر مهاری (MIC: ۰/2-0/۴ µl/ml) بر روی جدایه‌های *پروتوتکا زوپفی* بود. آویشن با MIC کمی پایین تر بین ۰/۶-۱µl/ml و گیاه میخک با MIC در محدوده ۰/۱-۸ µl/ml باعث مهار رشد جدایه‌های مورد بررسی شدند؛ درحالی که بقیه گیاهان دارویی MIC بالایی داشتند؛ به طوریکه MIC برای ریحان۵ µl/ml ، اسطوخودوس 7.8 µl/ml و رزماری 9.5 µl/ml بود (Grzesiak و همکاران،۲۰۱۶). بر خلاف مطالعه Grzesiak و همکارانش، مطالعه حاضر نشان داد که جدایه‌های پروتوتکای مورد بررسی به آمفوتریسین ب، با قطر هاله مهاری در محدوده 16-11 میلی متر، حساسیت داشتند.

در مطالعه دیگری از Grzesiak و همکارانش در سال ۲۰۱۸، اثر مهارکنندگی داروهای ضد قارچ شیمیایی و گیاهانی همچون sunsmile fruit و vegetable rinse را بر روی جدایه‌های *پروتوتکا زوپفی* جدا شده از شیر مبتلا به ورم پستان با استفاده از روش انتشار در آگار بررسی کردند. آنها نشان دادند که ۱۰۰٪ جدایه‌ها به فلوکونازول و فلوسایتوسین و ۹۰٪ به کلوتریمازول، ایکونازول و آمفوتریسین ب مقاوم بودند در حالی که ۵۰٪ جدایه‌ها به کتوکونازول و ۹۰ ٪ به نیستاتین حساس بودند. همچنین این محققین نشان دادند که تمام جدایه‌ها به Sunsmile fruit و Vegetable rinse در محدوده ۰/۰۱۹- ۰/۰۰۲ ٪ حساس بودند (Grzesiak و همکاران، ۲۰۱۸).

در مطالعه‌ای که Nardoni و همکارانش در سال ۲۰۱۸ در ایتالیا بر روی اثر مهارکنندگی ۳۰ عصاره مختلف گیاهی بر روی جدایه‌های *پروتوتکا زوپفی* و *پروتوتکا بلاشکی* انجام دادند مشخص شد که مرکبات پارادیسی با MIC ۰/۷۵ ٪ بیشترین اثر را روی هر دو گونه دارا بودند. همچنین MIC آمفوتریسین ب برای *پروتوتکا زوپفی* ۰/۲۵ µg/ml و *پروتوتکا بلاشکی* ۰/۱۹ µg/ml و MIC وریکونازول 6 µg/ml برای هردو گونه و MIC پساکونازول برای *پروتوتکا زوپفی* ۰/۳۸ µg/ml و *پروتوتکا بلاشکی* ۰/۵ µg/ml بدست آمد. یکی از دلایل اصلی اثر مهاری بالای مرکبات پارادایسی این است که ماده اصلی این مرکبات لیمونن می باشد که مونوترپن‌هایی مانند لیمونن و تیمول سبب آسیب به آنزیم‌های غشایی می‌شوند و ترکیب اسید چرب را تغییر داده و در نتیجه نفوذ پذیری غشا نیز تغییر می یابد (Nardoni و همکاران، ۲۰۱۸).

درمجموع یافته‌های فوق نشان می‌دهد که *پروتوتکا زوپفی* و *پروتوتکا ویکرهامی*، که به عنوان پروتوتکاهای مهم بیماری زا در ایجاد ورم پستان گاو می‌باشند، جلبک‌های هستند که به بسیاری از عصاره‌های گیاهان دارویی از جمله گیاهان مورد بررسی در مطالعه حاضر مقاوم می‌باشند. البته به نظر می‌رسد که عصاره کیوی نسبت به سایر عصاره‌ها از قدرت مهارکنندگی بیشتر در مقابل جدایه‌های پروتکا برخوردار است. این تاثیر را می‌توان به دلیل PH کمتر آن نسبت به سایر گیاهان مرتبط دانست. همچنین بر اساس مطالعات انجام شده در این زمینه و همینطور مطالعه حاضر، پروتوتکاهای مذکور از میان داروهای ضد قارچی شیمیایی نیز به نیستاتین و آمفوتریسین ب حساسیت بیشتری نسبت به سایر داروهای ضد قارچی نشان می‌دهند. به هر حال، با وجود مقاومت جدایه های پروتوتکا نسبت به گیاهان مطالعه حاضر، همچنان مشکلات در زمینه درمان پروتوتکوزیس

حیوانی بـه خصـوص ورم پسـتان ناشـی از آن در گاوهـای شیری با استفاده از داروهای ضد قارچ شیمیایی رایـج وجـود دارد و بنابراین پیشـنهاد مـی شـود کـه تحقیقـات بـر روی استفاده های درمانی ناشی از محصـولات طبیعـی و گیـاهی ادامه یابد.

تشکر و قدردانی

به این وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد و دانشکده دامپزشکی به خاطر تأمین اعتبـار طـرح تحقیقـاتی شماره ۳/۴۸۶۶۴ تشکر و قدردانی می گردد.

تعارض منافع

نویسندگان این مقاله هیچ گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

Bouari, C., Bolfa, P., Borza,G., Nadas, G., Catoi, C., Fit, N. 2014. Antimicrobial activity of Mentha piperita and Saturenja hortensis in a murine model of cutaneous protothecosis. Journal de Mycologie Medicale, **24**, 34-43.

Corbellini, L. G., Driemeier, D., Cruz, C., Dias, M. M., Ferreiro, L. 2001. Bovine mastitis due to Prototheca zopfii: clinical, epidemiological and pathological aspects in a Brazilian dairy herd. Tropical Animal Health and Production, **33(6)**, 463-470.

Cuc, C., Catoi, C., Fit, N., Rapuntean, S., Nadas, G., Bolfa, P., Taulescu, M., Gal, A., Tabaran, F., Nagy, A., Borza, G., Moussa, R. 2010. The inhibitory effect of some natural essential oils upon Prototheca algae in vitro growth. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, **67(1)**, 34-38.

Grzesiak, B., Glowacka, A., Krukowski, H., Lisowski, A., Lassa, H., Sienkiewicz, M. 2016. The in vitro efficacy of essential oils and antifungal drugs against *Prototheca zopfii*. Mycopathologia, **181(7-8)**, 609-615.

Grzesiak, B., Krukowski, H., Głowacka, A. 2018. The in vitro efficacy of SunSmile® Fruit & Vegetable Rinse against pathogenic strains of prototheca algae that cause mastitis in cows. Journal de Mycologie Medicale, **28(2)**, 300-304.

Jagielski, T., Bakuła, Z., Gawor, J., Maciszewski, K., Kusber, W. H., Dyląg, M., Nowakowska, J., Gromadka, R. Karnkowska, A. 2019. The genus Prototheca (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) revisited: Implications from molecular taxonomic studies. Algal Research, **43**, 101639.

Jagielski, T., Buzzini, P., Lassa, H., Malinowski, E., Branda, E., Turchetti, B., Polleichtner, A., Roesler, U., Lagneau, P. E., Marques, S., Silva, E., Thompson, G., Stachowiak, R., Bielecki, J. 2012. Multicentre Etest evaluation of in vitro activity of conventional antifungal drugs against European bovine mastitis Prototheca spp. isolates. Journal of antimicrobial chemotherapy, **67(8)**, 1945-1947.

Jagielski, T., Iskra, M., Bakuła, Z., Rudna, J., Roeske, K., Nowakowska, J., Bielecki, J. Krukowski, H. 2022. Occurrence of prototheca microalgae in aquatic ecosystems with a description of three new species, *Prototheca fontanea*, *Prototheca lentecrescens*, and *Prototheca vistulensis*. Applied and Environmental Microbiology, **88(22)**, e01092-22.

Kano, R. 2020. Emergence of Fungal-Like Organisms: Prototheca. Mycopathologia, **185**, 747-754.

Milanov, D. S., Suvajdzic, L. D. 2006. Characteristics and importance of the genus Prototheca in human and veterinary medicine. Zbornik Matice Srpske za Prirodne Nauke,**111**,15 – 27.

Nardoni, S., Mancianti, F. 2023. Prototheca spp. in bovine infections. Encyclopedia, **3(3)**, 1121-1132.

Nardoni, S., Pisseri, F., Pistelli, L., Najar, B., Luini, M., Mancianti, F. 2018. In vitro activity of 30 essential oils against bovine clinical isolates of *Prototheca zopfii* and *Prototheca blaschkeae*. Veterinary sciences, **5(2)**, 45.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts-second edition: approved standard M27-A2. NCCLS, Wayne, PA, USA.

Romani, A., Vignolini, P., Galardi, C., Aroldi, C., Vazzana, C., Heimler, D. 2003. Polyphenolic content in different plants part of soy cultivar grown under natural conditions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **51**, 5301–5306.
Stenner, V. J., Mackay, B., King, T., Barrs, V. R. D., Irwin, P., Abraham, L., Swift, N., Langer, N., Bernays, M., Hampson, E., Martin, P., Krockenberger, M. B., Bosward, K., Latter, M., Malik, R. 2007. Protothecosis in 17 Australian dogs and a review of the canine literature. Medical Mycology, **45**, 249-266.
Tortorano, A. M., Prigitano, A., Dho, G., Piccinini, R., Dapra, V., Viviani, M. A. 2008. In vitro activity of conventional antifungal drugs and natural essences against the yeast-like alga Prototheca. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **61(6)**, 1312-1314.
Wawron, W., Bochniarz, M., Piech, T., Wysocki, J., Kocik, M. 2013. Antimicrobial susceptibility of *Prototheca zopfii* isolated from bovine mastitis. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, **57**, 485-488.