

## تأثیر انواع عصاره‌های پسته کوهی (*Pistacia atlantica* subsp. *Kurdica*) بر تریکوموناس واژینالیس در شرایط برون تنی

محمد متینی<sup>۱\*</sup>، سمیرا بختیارنژاد<sup>۲</sup>، دارا دستان<sup>۳</sup>، امیرحسین مقصود<sup>۴</sup>، محمد فلاح<sup>۵</sup>

تاریخ دریافت ۱۳۹۶/۱۱/۲۳ تاریخ پذیرش ۱۳۹۷/۰۲/۰۹

### چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** پیش‌زمینه و هدف: تریکومونیاژیس یکی از شایع‌ترین عفونت‌های غیرویروسی جنسی در سراسر جهان است که موارد مقاوم به درمان این عفونت در حال افزایش می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی میزان تأثیر عصاره‌های پسته کوهی در شرایط برون تنی بر روی تریکوموناس واژینالیس بود. **مواد و روش‌ها:** عصاره‌های هگزانی، اتیل‌استاتی، متانولی و هیدروالکلی پسته کوهی با روش خیساندن تهیه گردید و سپس غلظت‌های ۲۰۰۰، ۴۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵ تهیه و بر روی پنج ایزوله انگل تریکوموناس واژینالیس، در مقابل مترونیدازول، در شرایط هوازی و بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای °C ۳۵/۵، مورد آزمایش قرار گرفت. آزمون (Minimum Inhibitory Concentration) MIC و (Minimum Lethal Concentration) MLC برای هر ایزوله انگل به صورت دوتایی و دومرتبه تکرار گردید.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد انواع عصاره‌های مورد بررسی در برابر تریکوموناس واژینالیس مؤثر بود. بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون بیشترین اثر مربوط به عصاره‌های اتیل‌استاتی و هگزانی با حداقل MIC برابر ۱۲۵ µg/ml و به ترتیب میانگین MIC برابر ۳۳۷ و ۳۸۷ µg/ml و کم‌ترین اثر مربوط به عصاره‌های متانولی و هیدروالکی با حداقل و میانگین MIC برابر ۲۰۰۰ µg/ml بود. نتایج آزمون MLC برای عصاره‌ها برابر نتایج آزمون MIC بود که این موضوع تأییدی بر اثر کشندگی عصاره‌های مورد آزمایش بر روی انگل می‌باشد. میزان حساسیت دارویی انگل‌ها به مترونیدازول از ۳/۱ تا ۶/۲ با میانگین و انحراف استاندارد ۱/۵ ± ۴/۲ به دست آمد. **بحث و نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که ترکیبات موجود در عصاره‌های اتیل‌استاتی و هگزانی پسته کوهی دارای توان قابل‌توجهی بر ضد تریکوموناس واژینالیس می‌باشند که لازم است با جداسازی و شناسایی ترکیبات موجود در این عصاره‌ها و همچنین انجام مطالعات تکمیلی بر روی آن‌ها در شرایط برون تنی و درون تنی اطلاعات جامع‌تری در زمینه خصوصیات ضد میکروبی این گیاه و ترکیبات حاصل از آن کسب گردد. **واژگان کلیدی:** تریکوموناس واژینالیس، پسته کوهی، عصاره، مترونیدازول

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و نهم، شماره سوم، صص ۲۰۷-۱۹۸، خرداد ۱۳۹۷

آدرس مکاتبه: همدان، بلوار شهید فهمیده، دانشکده پزشکی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، تلفن: ۰۸۱-۳۸۳۸۰۵۷۲

Email: matini@umsha.ac.ir

### مقدمه

در سراسر جهان است (۱). سازمان بهداشت جهانی میزان شیوع تریکومونیاژیس را در سراسر جهان ۲۷۶/۴ میلیون مورد در سال و بیش از شیوع سیفلیس، گنوره، و عفونت کلامیدیایی گزارش نموده است (۲). این عفونت در انسان می‌تواند به اشکال بدون علامت و یا

تریکوموناس واژینالیس تک‌یاخته‌ای تاژک‌دار متعلق به خانواده تریکومو نادیده بوده که در انسان ایجاد تریکومونیاژیس ادراری-تناسلی می‌نماید که یکی از عفونت‌های مقاربتی شایع غیرویروسی

<sup>۱</sup> استادیار گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان (نوآسنده مسئول)

<sup>۲</sup> کارشناس ارشد انگل‌شناسی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

<sup>۳</sup> استادیار گروه فارماکولوژی و بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

<sup>۴</sup> مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و فرآورده‌های طبیعی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

<sup>۵</sup> دانشیار گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

<sup>۶</sup> استاد گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

دستگاه گوارش از جمله هلیکوباکتر پیلوری و سالمونلا تیفی موریوم گزارش گردیده است (۱۶). خواص ضد میکروبی این گیاه می‌تواند ناشی از ترکیبات موجود در آن از قبیل آلفا توجن ( $\alpha$ -Thujene)، آلفا پینن ( $\alpha$ -Pinene)، کامفن (Camphene)، سابینن (Sabinene)، بتا پینن ( $\beta$ -Pinene)، دلتا-۳ کارن ( $\Delta$ -3-Carene) لیمونن ( $\alpha$ -Limonene) (۱۱) و یا ناشی از وجود ترکیبات فنلی در آن باشد (۱۷).

به دلیل مسائل مطرح شده در رابطه با درمان تریکومونیاژیس، تحقیق در رابطه با ترکیبات دارویی جدید با اثربخشی مناسب برای درمان این عفونت جزء الزامات بهداشتی می‌باشد. با توجه به اینکه گیاهان از دیرباز به صورت گسترده برای درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های عفونی مورد استفاده قرار می‌گرفته‌اند و به دلیل وجود پتانسیل ضد میکروبی در *P. atlantica* و همچنین با در نظر گرفتن اینکه تاکنون اثرات این گیاه علیه انگل تریکوموناس واژینالیس مورد ارزیابی قرار نگرفته است، در این تحقیق تأثیر انواع عصاره‌های مختلف آن در شرایط برون تنی بر روی تریکوموناس واژینالیس مورد مطالعه قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری و آماده‌سازی انگل:

این تحقیق از نوع تجربی-آزمایشگاهی بوده که بر روی پنج ایزوله انگل تریکوموناس واژینالیس جدا شده از افراد آلوده، در آزمایشگاه تحقیقاتی گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی همدان انجام گردید. نمونه‌های انگل از بیماران مشکوک به تریکومونیاژیس که به مراکز بهداشتی درمانی در سطح شهر همدان مراجعه می‌کردند، به دست آمد. جهت تشخیص انگل تریکوموناس واژینالیس از روش گسترش مرطوب و کشت در محیط دورسه (*Dorset medium*) استفاده گردید (۱۸). پس از تشخیص نمونه‌های مثبت، این نمونه‌ها به محیط کشت دیاموند (۱۹) منتقل و طی چند مرحله کشت متوالی طی چند روز، کشت خالص و اگزینیک انگل به منظور استفاده در آزمون تعیین میزان حساسیت به عصاره‌های گیاهی، مهیا گردید (۲۰).

### تهیه عصاره گیاهی:

میوه پسته کوهی با نام علمی *P. atlantica* subsp. *Kurdica* از رویشگاه طبیعی آن در استان کردستان جمع‌آوری شد. پس از شناسایی و تأیید آن توسط متخصص گیاه‌شناس مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کردستان، شماره هر بار میوه (MPH-11854) به آن تعلق گرفت. روند خشک نمودن میوه گیاه در دمای اتاق و دور از نور انجام گرفت. سپس در آزمایشگاه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی همدان

علامت‌دار و با شدت علائم بالینی متفاوت ظاهر گردد. همچنین تریکومونیاژیس می‌تواند عوارضی مانند تولد زودرس نوزادان، افزایش استعداد ابتلا به سرطان دهان رحم و افزایش خطر انتقال ویروس پاپیلومایی انسانی و نقص ایمنی انسان (HIV) را به دنبال داشته باشد (۳، ۱). از سال ۱۹۶۱ تاکنون مترونیدازول، به عنوان یکی از ترکیبات گروه نیتروایمیدازول‌ها، تنها داروی مورد تأیید در اکثر کشورهای جهان برای درمان تریکومونیاژیس بوده است. استفاده از این دارو جهت درمان عفونت ناشی از تریکوموناس واژینالیس با دو چالش عوارض جانبی و شکست درمانی و یا به عبارتی مقاومت دارویی انگل، مواجهه بوده است. اولین مورد مقاومت دارویی تریکوموناس واژینالیس در همان اوایل استفاده از دارو در سال ۱۹۶۲ مشاهده گردید که به تدریج گزارش موارد مقاومت افزایش یافت. مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها در آمریکا (CDC) میزان مقاومت دارویی انگل‌های تریکوموناس واژینالیس را بین ۲ تا ۵ درصد تخمین زده است (۵، ۴).

در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در زمینه اثر ضد میکروبی گیاهان و ترکیبات مختلف آن‌ها مانند ترپنوئیدها، کومارین‌ها، فلاونوئیدها، ترکیبات فنلی و غیره انجام شده است (۹-۶). از جمله گیاهانی که دارای خواص ضد میکروبی هستند، گیاه پسته (*Pistacia* sp.) از تیره *Anacardiaceae* با ۱۵ گونه در سراسر جهان، می‌باشد که سه گونه آن شامل *P. vera*، *P. Khinjuk* و *P. atlantica* بومی ایران بوده و در ایران می‌رویند. گونه *P. atlantica* یا بنه دارای سه زیرگونه به نام *kurdica*، *cabulica*، *mutica* است که زیرگونه اخیر در شمال و غرب ایران بخصوص منطقه اورامانات در استان کردستان و همچنین کوه‌های زاگرس، از انتشار وسیعی برخوردار است (۱۱، ۱۰). در طب سنتی، قسمت‌های مختلف گونه‌های *Pistacia* شامل صمغ، میوه، برگ و اندام‌های هوایی برای اهداف مختلفی استفاده می‌شوند. در ایران از صمغ *P. atlantica* جهت درمان اختلالات گوارشی، کبدی، کلیوی، تنفسی و درمان زخم‌های پوستی استفاده می‌گردد (۱۲).

بر اساس اطلاعات موجود مطالعه‌ای در رابطه با تأثیر گیاه پسته کوهی بر روی تریکوموناس واژینالیس انجام نشده است. در رابطه با فعالیت ضد تک‌یاخته‌ای این گیاه می‌توان تأثیر آن بر روی درمان ضایعات پوستی ناشی از لیشمانیا ماژور در مدل حیوانی را بیان نمود (۱۳). تعدادی مطالعه نیز در رابطه با اثرات ضد باکتریایی این گیاه انجام شده است که از جمله آن‌ها می‌توان به تأثیر عصاره آبی آن بر روی باکتری اشرشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس (۱۴) و باکتری‌های ساکن دهان شامل استرپتوکوک میتیس و استرپتوکوک موتانس اشاره نمود (۱۵). همچنین تأثیر اسانس پسته کوهی بر تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی ساکن

آزمایش در شرایط سترون و در برابر آزمون شاهد (شاهد منفی عاری از هرگونه ترکیب گیاهی و دارویی، شاهد مثبت حاوی داروی مترونیدازول و شاهد حلال حاوی DMSO) انجام گرفت.

#### آزمون تعیین حداقل غلظت کشندگی (MLC):

علاوه بر آزمون MIC، آزمون تعیین حداقل غلظت کشندگی<sup>۲</sup> یا MLC نیز در این مطالعه به منظور ارزیابی دقیق‌تر اثر ترکیبات مورد آزمایش، استفاده گردید. پس از انجام آزمون MIC (بعد از ۴۸ ساعت)، از هر چاهک آزمون به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محتویات آن برداشت کرده و در محیط کشت دیاموند که عاری از هرگونه ترکیب گیاهی و دارویی بود، کشت مجدد داده شد و در گرمخانه در دمای ۳۵/۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و روزانه تا ۱۰ روز لوله‌های محیط کشت با میکروسکوپ معکوس از نظر رشد انگل مورد بررسی قرار گرفتند. کم‌ترین غلظتی از ترکیبات گیاهی و دارویی که در لوله کشت مربوط به آن رشد انگل مشاهده نگردید به‌عنوان میزان MLC در نظر گرفته شد.

#### تجزیه و تحلیل آماری:

جهت تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS V.16 و آزمون ناپارامتریک فریدمن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ جهت مقایسه میانگین‌های MIC ترکیبات مورد آزمایش، استفاده گردید.

#### یافته‌ها

به‌منظور ارزیابی میزان تأثیر عصاره‌های هگزانی، اتیل‌استاتی، متانولی و هیدروالکلی پسته کوهی بر روی پنج ایزوله انگل تریکوموناس واژینالیس در مقایسه با داروی مترونیدازول، در مجموع برای هر ترکیب گیاهی (نمودار ۱ و ۲) و دارویی ۲۰ سری آزمایش انجام گرفت که میانگین‌های به‌دست‌آمده از این آزمایش‌ها در ادامه آورده شده است.

جدول شماره ۱ اثر انواع عصاره‌های پسته کوهی در مقایسه با مترونیدازول، بر روی ایزوله‌های تریکوموناس واژینالیس بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌گردد بیشترین تأثیر مربوط به عصاره هگزانی ( $MIC=250\mu\text{g/ml}$ ) و کم‌ترین تأثیر مربوط به عصاره متانولی و هیدروالکلی ( $MIC=4000\mu\text{g/ml}$ ) می‌باشد ( $P<0/001$ ). همچنین در این جدول اثر عصاره‌های پسته کوهی در مقایسه با مترونیدازول، بر روی انگل بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون، نیز نشان داده شده است. بعد از افزایش زمان مجاورت، اثر عصاره‌ها در مقایسه با کنترل منفی افزایش یافته بود به‌طوری‌که بیشترین تأثیر مربوط به عصاره‌های اتیل‌استاتی و هگزانی ( $MIC=125\mu\text{g/ml}$ ) بود ( $P<0/001$ ).

جهت استخراج عصاره به روش زیر اقدام گردید. به‌منظور استخراج عصاره‌های مختلف، میوه خشک‌شده گیاه را پودر کرده و سپس از ۱۰۰ گرم پودر حاصل به ترتیب با حلال‌های هگزان (H)، اتیل‌استات (E)، متانول (M) و حلال هیدروالکلی آب/متانول (۷۰/۳۰) به روش خیساندن (Maceration) در دمای اتاق به مدت ۷۲ ساعت و ۳ بار تکرار، عصاره‌گیری بر روی شیکر انجام گرفت. سپس محلول حاصل به‌وسیله کاغذ صافی واتمن شماره ۴۱ پالایش گردید و عصاره‌های به‌دست‌آمده در دستگاه تبخیرکننده دوار (Heidolph, Germany) تغلیظ شده و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شدند (۲۱).

#### تهیه محلول مترونیدازول:

ابتدا پودر مترونیدازول (Sigma Chemical Co. St Louis) با غلظت معین در آب مقطر حل و محلول حاصل به‌وسیله فیلتر سرنگی با منافذ ۰/۲۲ میکرون استریل گردید. سپس غلظت‌هایی از دارو در محیط کشت دیاموند به‌وسیله روش رقیق‌سازی متوالی دو برابر در میکروپلیت‌های استریل تهیه گردید تا غلظت‌های نهایی ۰/۱ تا ۴۰۰  $\mu\text{g/ml}$  به دست آمد.

#### آزمون تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC):

حداقل غلظت مهارکنندگی<sup>۱</sup> یا MIC عبارت بود از حداقل غلظتی از عصاره و داروی مترونیدازول که بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون باعث بی‌حرکت شدن انگل‌ها در محیط کشت گردد (۲۲).

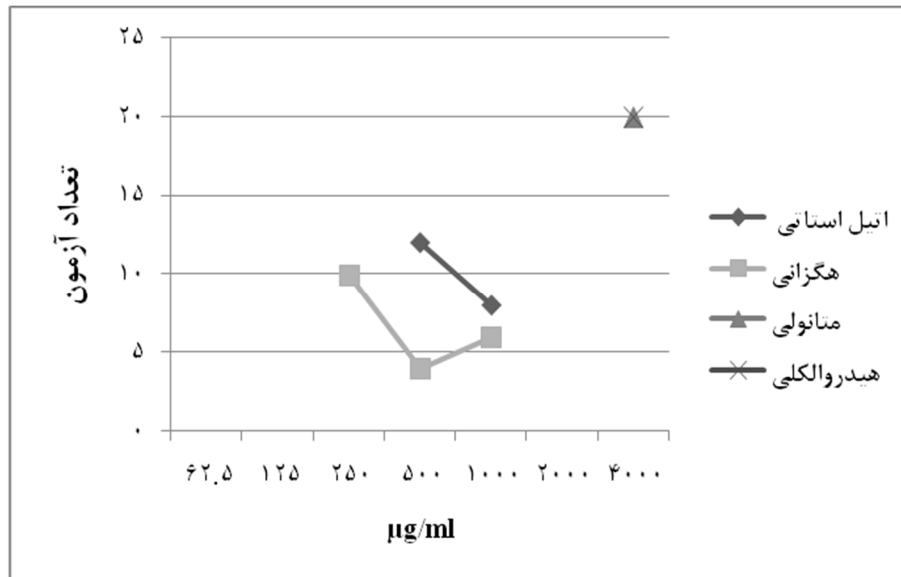
آزمون تعیین میزان حساسیت انگل به عصاره‌ها، مطابق با روش پیشنهادی CDC انجام گرفت (۲۲). به‌این‌ترتیب که انگل‌های جداشده بعد از خالص‌سازی و آگزینیک شدن در محیط کشت دیاموند، در فاز رشد لگاریتمی و به تعداد مشخص ( $10^5 \times 1$  سلول در هر چاهک آزمون) بعد از شمارش با لام هموستیومتر، مورد استفاده قرار گرفتند. محلول‌هایی از عصاره‌ها با غلظت اولیه ۲۰  $\text{mg/ml}$  در حلال دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO, D2650) (SIGMA, BioReagent) تهیه گردید. سپس غلظت‌هایی از عصاره‌ها در محیط کشت دیاموند به‌وسیله روش رقیق‌سازی متوالی دو برابر در میکروپلیت‌های استریل تهیه گردید تا در پایان کار و بعد از اضافه نمودن محیط کشت حاوی انگل به آن، غلظت‌های نهایی متوالی برابر  $62/5, 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000 \mu\text{g/ml}$  به دست آمد. سپس میکروپلیت‌های آزمون در گرمخانه در دمای ۳۵/۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط هوایی قرار داده شدند و بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت با میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش برای هر ترکیب گیاهی و مترونیدازول و همچنین برای هر انگل، دومرتبه و هر مرتبه به‌صورت دوتایی انجام شد. کلیه مراحل

2 Minimum Lethal Concentration

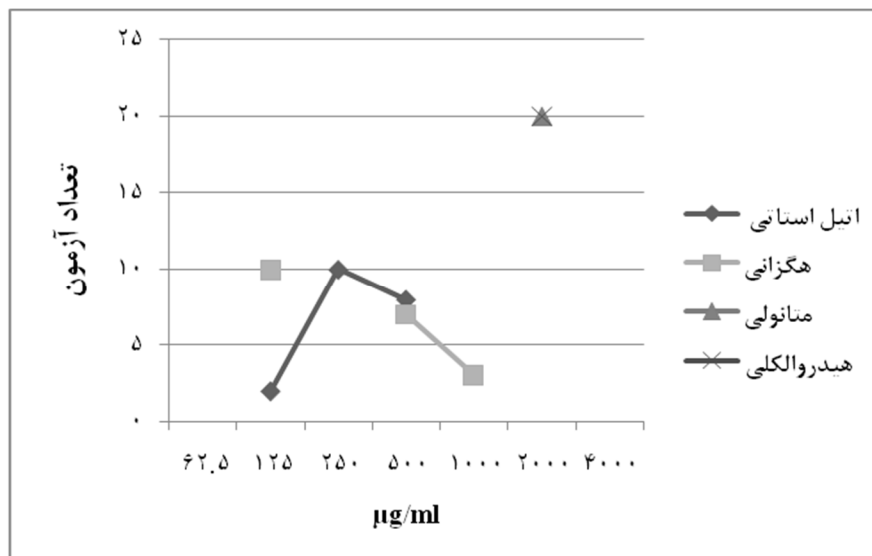
1 Minimum Inhibitory Concentration

به آزمایش حساسیت دارویی مترونیدازول نیز نشان داد که همه ایزوله‌های تریکوموناس واژینالیس مورد آزمایش نسبت به مترونیدازول حساس بودند و میانگین MIC بعد از ۴۸ ساعت آن‌ها برابر  $4/2 \mu\text{g/ml}$  به دست آمد.

نتایج آزمایش MLC نیز (که جهت تأیید اثر عصاره‌ها بر انگل صورت گرفت) برای انواع عصاره‌ها برابر نتایج آزمایش MIC مربوط به هر عصاره بود که این امر نشان‌دهنده تأثیر کشندگی عصاره‌ها بر انگل در غلظت‌های MIC مربوط به هر عصاره، می‌باشد. نتایج مربوط



نمودار (۱): مقایسه میزان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره‌ها بر روی پنج ایزوله تریکوموناس واژینالیس بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون



نمودار (۲): مقایسه میزان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره‌ها بر روی پنج ایزوله تریکوموناس واژینالیس بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون

**جدول (۱):** حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) انواع عصاره‌های پسته کوهی بر روی تریکوموناس واژینالیس بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت

p-value	میزان MIC بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون			میزان MIC بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون			نوع عصاره و دارو
	(μg/ml)			(μg/ml)			
	میانگین و انحراف معیار	حداکثر	حداقل	میانگین و انحراف معیار	حداکثر	حداقل	
p<۰/۰۰۱	۳۳۷±۱۴۱	۵۰۰	۱۲۵	۷۰۰±۲۵۱	۱۰۰۰	۵۰۰	اتیل‌استاتی
	۳۸۷±۳۱۶	۱۰۰۰	۱۲۵	۵۲۵±۳۳۳	۱۰۰۰	۲۵۰	هگزانی
	۲۰۰۰±۰	۲۰۰۰	۲۰۰۰	۴۰۰۰±۰	۴۰۰۰	۴۰۰۰	متانولی
	۲۰۰۰±۰	۲۰۰۰	۲۰۰۰	۴۰۰۰±۰	۴۰۰۰	۴۰۰۰	هیدروالکلی
	۴/۲±۱/۵	۶/۲	۳/۱	۱۲/۵±۰	۱۲/۵	۱۲/۵	مترونیدازول

### بحث و نتیجه‌گیری

مسئله مقاومت دارویی در میان عوامل بیماری‌زای میکروبی یک مسئله مهم و نگران کننده است که روبه فزونی بوده و به‌عنوان یک عامل خطر، سلامت و بهداشت جامعه را با تحدید روبرو نموده است. مترونیدازول از سال‌های اول دهه شصت در سراسر جهان و تینیدازول در سال‌های اخیر در بعضی از کشورها، تنها ترکیبات دارویی مورد تأیید برای درمان تریکومونیاژیس بوده‌اند. شکست درمانی تریکومونیاژیس با مترونیدازول که از همان سال‌های اول استفاده از این دارو گزارش گردید، روبه افزایش بوده و گزارش‌های متفاوتی از شکست درمانی تریکومونیاژیس از جوامع مختلف، منتشر شده است بطور مثال بعضی گزارش‌ها میزان شکست درمانی تریکومونیاژیس با مترونیدازول را در ایالات متحده تا ۱۰٪ تخمین زده‌اند (۲۲). تاکنون تأثیر تعدادی از گیاهان دارویی مانند مخلصه، مریم‌گلی، نعنای، اسطوخودوس، بنفشه معطر و غیره بر روی تریکوموناس واژینالیس مورد مطالعه قرار گرفته است (۲۳). پسته کوهی که به‌صورت درخت یا درخچه در مناطقی از جهان مشاهده می‌شود، از دیرباز برای درمان بعضی از بیماری‌ها استفاده می‌شده است. بطور مثال در طب سنتی یونان، بالغ‌بر ۲۵۰۰ سال از صمغ این گیاه برای اختلالات گوارشی از جمله، درد عصبی معده، سوءهاضمه و زخم معده استفاده می‌کرده‌اند است به‌طوری‌که امروزه گزارشاتی دال بر فعالیت ضد میکروبی این گیاه و تأثیر بر باکتری هلیکوباکتر پیلوری وجود دارد (۱۳).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که انواع عصاره‌های پسته کوهی مورد استفاده قادرند مانع رشد و حرکت تریکوموناس واژینالیس در محیط کشت شده و در نهایت باعث مرگ آن‌ها گردند. بعد از ۲۴ ساعت مجاورت عصاره و انگل بیشترین تأثیر به ترتیب مربوط به عصاره هگزانی (۲۵۰ μg/ml)، اتیل‌استاتی (۵۰۰ μg/ml) و عصاره‌های متانولی و هیدروالکلی (۲۰۰۰ μg/ml) بود. فعالیت عصاره‌ها بر انگل وابسته به غلظت و همچنین زمان تماس بود

به‌طوری‌که پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون بیشترین تأثیر مربوط به عصاره‌های اتیل‌استاتی و هگزانی با حداقل MIC برابر ۱۲۵ μg/ml و کم‌ترین تأثیر مربوط به عصاره‌های متانولی و هیدروالکلی با حداقل MIC برابر ۲۰۰۰ μg/ml به‌دست آمد. بررسی میکروپلیت‌های آزمون تا ۷۲ ساعت نشان داد که عصاره‌ها در غلظت‌های کم‌تری نسبت به زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، مانع رشد و حرکت انگل در محیط کشت می‌گردند اما با توجه به اینکه بعد از گذشت زمان ۷۲ ساعت انکوباسیون، رشد انگل در محیط کشت از فاز رشد لگاریتمی خارج شده و با نامساعدتر شدن شرایط محیطی، قضاوت صحیح از میزان تأثیر عوامل مورد مطالعه دشوار می‌گردد، بنابر این در این مطالعه معیار تأثیر عصاره‌های مورد بررسی بر تریکوموناس واژینالیس تا زمان ۴۸ ساعت در نظر گرفته شد. نتایج به دست آمده از آزمایش MLC برای عصاره‌ها مورد بررسی نیز مشابه نتایج آزمایش MIC مربوط به هر عصاره بود و نتایج این آزمایش تأییدی بر تأثیر کشندگی عصاره‌ها بر روی تریکوموناس واژینالیس می‌باشد. همچنین نتایج آزمایش حساسیت دارویی نیز نشان داد که همه ایزوله‌های تریکوموناس واژینالیس مورد بررسی در این تحقیق، نسبت به مترونیدازول از حساسیت مناسبی برخوردار بودند.

از مطالعات صورت گرفته در رابطه با تأثیر گیاه پسته کوهی بر روی سایر عوامل میکروبی می‌توان به مطالعه تاران و همکاران اشاره نمود. در این مطالعه درون‌تنی که بر روی موش‌های آلوده به لیشمانیا ماژور انجام شد، نشان داده شد که استفاده موضعی از صمغ حاصل از این گیاه (*P. atlantica* var. *Kurdic*) در مقایسه با داروی گلوکانتیم، به‌طور معنی‌داری می‌تواند باعث کاهش اندازه قطر زخم‌های پوستی شده و همچنین بعد از طی دوره درمان نیز می‌تواند باعث کاهش تعداد موش‌های آلوده و مثبت (از نظر انگل‌شناسی)، گردد (۱۳). مطالعه میترا عزیزیان و همکاران نیز خاصیت ضدباکتریایی عصاره آبی پسته کوهی را نشان داد. در این تحقیق میزان MIC عصاره آبی *P. atlantica* برای باکتری‌های اشرشیا

تعیین گردید که نتیجه‌ای امیدوار کننده برای درمان افراد آلوده به تریکومونیاژیس مقاوم به ترکیبات نیتروایمیدازول می‌باشد (۲۷). یکی از بررسی‌های صورت گرفته بر انگل در شرایط برون تنی مطالعه انجام شده در ترکیه با ترکیبات گونه درخت توت فرنگی *Arbutus unedo* می‌باشد. عصاره اتیل‌استاتی برگ این گونه در غلظت  $500 \mu\text{g/ml}$  دارای  $100\%$  قدرت ممانعت کنندگی از رشد انگل بود. نتیجه حاصل از این مطالعه با نتیجه به دست آمده از عصاره اتیل‌استاتی پسته کوهی در مطالعه ما هماهنگی دارد و این دو عصاره بعد از ۲۴ ساعت بر تریکوموناس واژینالیس به یک میزان مؤثر بودند (۲۸).

از جمله مطالعاتی که در ایران انجام شده، می‌توان به بررسی تأثیر موسیر (*Allium hirtifolium*) اشاره نمود. مطالعه انجام شده توسط تاران و همکاران نشان داد عصاره هیدروآلیکلی و دی کلرومتانی موسیر ایرانی (*Persian shallot*) تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر مهار رشد تریکوموناس واژینالیس دارد و میزان MIC بعد از ۴۸ ساعت آن به ترتیب برابر  $10 \mu\text{g/ml}$  و  $5 \mu\text{g/ml}$ ، در مقابل مترونیدازول با MIC برابر  $2 \mu\text{g/ml}$  بود. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که اثر موسیر به مراتب قوی‌تر از تأثیر پسته کوهی مورد بررسی در مطالعه حاضر، بر حیات تریکوموناس واژینالیس است که می‌تواند ناشی از وجود ترکیبات ارگانوسولفور مانند آلیسین (*allicin*) و آجوئن (*ajoene*) در سیر و سایر گونه‌های جنس *Allium* باشد که خاصیت ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای به این گیاهان داده است (۲۹). در بررسی تأثیر اکالیپتوس (*Eucalyptus camaldulensis*) توسط حسنی و همکاران نشان داده شد که از میان انواع عصاره‌های مورد آزمایش عصاره اتیل‌استاتی بیشترین تأثیر را بر روی تریکوموناس واژینالیس دارد و بعد از ۲۴ ساعت غلظت  $12/5 \text{ mg/ml}$  این عصاره،  $100\%$  مانع از رشد انگل می‌گردد (۳۰) که تأثیر آن بر انگل کم‌تر از تأثیر عصاره اتیل‌استاتی پسته کوهی با میزان MIC برابر  $500 \mu\text{g/ml}$  می‌باشد. همچنین نائی و همکاران گزارش نمودند که انواع عصاره‌های گل، برگ و ساقه گیاه ریواس (*Rheum ribes L.*) در غلظت‌های  $0/5$  و  $1 \text{ mg/ml}$  می‌توانند،  $100\%$  مانع از رشد تریکوموناس واژینالیس گردد (۳۱) که این میزان اثربخشی گیاه ریواس در محدوده اثربخشی گیاه پسته کوهی در مطالعه ما می‌باشد. خان‌محمدی و همکاران تأثیر گیاه کمای بیابانی (*Ferula szowitsiana*)، متعلق به خانواده چتریان، را بر روی تریکوموناس واژینالیس مورد مطالعه قرار دادند. در این تحقیق غلظت  $2 \text{ mg/ml}$  عصاره متانولی باعث عدم رشد انگل بعد از ۷۲ ساعت گردید و حداقل غلظت لازم برای کشتن نیمی از انگل‌ها در محیط کشت برابر  $0/36 \text{ mg/ml}$  تعیین گردید که تأثیر عصاره متانولی کمای بیابانی

کلی، سودوموناس آرتروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب  $104/16$ ،  $163$  و  $204/67 \mu\text{g/ml}$  تعیین گردید (۱۴). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که تأثیر این گیاه بر باکتری‌های مذکور بیش از تأثیر آن بر تک‌یاخته تریکوموناس واژینالیس می‌باشد. همانند بسیاری از ریزجانداران، مطالعاتی در رابطه با تأثیر گیاهان دارویی بر روی تریکوموناس واژینالیس صورت گرفته است. از جمله تحقیقات صورت گرفته در سایر نقاط جهان می‌توان به بررسی تأثیر اسطوخودوس که بومی مناطق خشک و نیمه خشک جنوب اروپا است، بر روی این انگل اشاره نمود. بررسی تأثیر اسانس به دست آمده از دو گونه اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia*, *× intermedia*) نشان داد که این ترکیبات در غلظت  $1/1$  بعد از ۲۴ ساعت می‌توانند باعث مرگ کلیه انگل‌ها گردند (۲۴). همچنین نتایج مطالعه انجام شده توسط Calzada و همکاران در مکزیک با استفاده از ۲۲ گونه از گیاهان مورد استفاده در طب سنتی این کشور، مشخص نمود، دو گونه از این گیاهان بیشترین تأثیر را بر رشد این تک‌یاخته دارند که این دو گونه عبارت بودند از عصاره دانه خربزه درختی (*Carica papaya*) و فیبر پوسته نارگیل (*Cocos nucifera*) که به ترتیب دارای قدرت تأثیری برابر با  $5/6 \text{ IC}_{50}$  و  $5/8 \text{ IC}_{50}$  بودند که در مقایسه با گیاه پسته کوهی از تأثیر بیشتری بر تریکوموناس واژینالیس برخوردار می‌باشد (۲۵). از معدود مطالعات صورت گرفته در رابطه با درمان تریکومونیاژیس با گیاهان دارویی می‌توان به یک مطالعه کارآزمایی بالینی کنترل شده در برزیل اشاره نمود که بر روی دو گروه از زنان مبتلا به تریکومونیاژیس انجام گردید، در گروه درمان شده با سکندازول که به صورت تک دز ( $2000 \text{ mg}$ ) استفاده شد، میزان بهبودی  $96/6\%$  و در گروه درمان شده با گیاه *Mentha crisper* گونه‌ای از جنس نعناع و خانواده *Lamiaceae*، که آن هم به صورت تک دز ( $24 \text{ mg}$ ) استفاده گردید میزان بهبودی  $90\%$  به دست آمد که از نظر آماری اختلاف معنی‌دار بین دو گروه مشاهده نگردید (۲۶). این مطالعه نشان داد که گیاه *M. crisper* می‌تواند جایگزین مناسبی جهت درمان تریکومونیاژیس که از عوارض کم‌تری نیز برخوردار است، باشد. همچنین در طی سال‌های ۲۰۰۵ تا ۲۰۰۸ میلادی مطالعه‌ای در مصر بر روی ۳۳ بیمار مبتلا به تریکومونیاژیس مقاوم به مترونیدازول و تینیدازول صورت گرفت که در این مطالعه از صمغ گیاه مرمکی (*Myrrh*) با نام علمی *Commiphora molmol* استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که مصرف روزانه  $600 \text{ mg}$  از صمغ این گیاه به مدت ۶ تا ۸ روز باعث رفع علائم بالینی و بهبودی کامل افراد آلوده و همچنین منفی شدن آزمایشات انگل شناسی می‌گردد. میزان بهبودی در این افراد با این ترکیب طبیعی  $84/6\%$

تکمیلی بر روی آنها را در شرایط برون تنی و مدل حیوانی راه دارا می‌باشد.

### تشکر و قدردانی

این گزارش برگرفته شده از پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته انگل‌شناسی بوده که بدین‌وسیله نویسندگان مراتب سپاسگزاری خود را از معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی همدان به دلیل حمایت مالی (شماره طرح ۹۵۰۷۱۳۴۱۳۱) و معنوی از این طرح تحقیقاتی، اعلام می‌دارند. در ضمن از کلیه همکاران آزمایشگاه‌های دانشکده پزشکی و دارو سازی دانشگاه علوم پزشکی همدان که در انجام این تحقیق ما را یاری نموده‌اند، نهایت سپاسگزاری و قدردانی را داریم.

### تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی را اعلام نکرده‌اند.

### ملاحظات اخلاقی

این پایان‌نامه در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی همدان مطرح و با شناسه اختصاصی IR.UMSHA.REC.1395.108 مورد تصویب قرار گرفت.

برابر تأثیر عصاره متانولی پسته کوهی بعد از ۴۸ ساعت در مطالعه حاضر است (۳۲).

در انتها لازم به ذکر است که در مطالعات صورت گرفته جهت بررسی تأثیر گیاهان دارویی بر روی تریکوموناس واژینالیس از روش و از زمان‌های انکوباسیون متفاوتی استفاده شده است و نتایج نیز متفاوت و به‌صورت درصد ممانعت از رشد یا Growth inhibitory percent، IC<sub>50</sub>، IC<sub>90</sub>، LD<sub>50</sub> و MIC گزارش شده‌اند. که این امر مقایسه تأثیرات آن‌ها را بر انگل تاحدی دشوار نموده است. به همین دلیل در تحقیق حاضر سعی شده است از روش استاندارد و پیشنهادی CDC که به‌منظور تعیین میزان حساسیت دارویی تریکوموناس واژینالیس ارائه شده، استفاده گردد و تاکید بر MIC بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت بوده تا نتایج به‌دست آمده استانداردتر و قابل قیاس با نتایج آزمون تعیین حساسیت داروی مترونیدازول باشد. چالش دیگری که مطالعه حاضر و اغلب مطالعات انجام شده با آن روبرو هستند عدم استفاده از ایزوله‌های استاندارد مقاوم به مترونیدازول می‌باشد که در مطالعه حاضر سعی شد با استفاده از پنج ایزوله انگل این محدودیت تا حدی جبران گردد.

نتایج این تحقیق نشان داد که ترکیبات موجود در عصاره‌های پسته کوهی دارای توان کشندگی قابل توجهی علیه تریکوموناس واژینالیس بوده و این گیاه پتانسیل لازم برای تحقیقات بیشتر شامل استخراج و خالص سازی جزء یا اجزاء مؤثر و همچنین انجام مطالعات

## References:

- Schwebke JR, Burgess D. Trichomoniasis. Clin Microbiol Rev 2004; 17(4): 794-803.
- World Health Organization (WHO) 2012. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections—2008. Geneva 2012; Available from: <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rts/stisestimates/en/index.html>.
- Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G. Clinical and microbiological aspects of Trichomonas vaginalis. Clin Microbiol Rev 1998; 11(2): 300-17.
- Schmid G, Narcisi E, Mosure D, Secor WE, Higgins J, Moreno H. Prevalence of metronidazole-resistant Trichomonas vaginalis in a gynecology clinic. J Reprod Med 2001; 46(6): 545-9.
- Workowski KA, Berman SM. Centers for Disease Control and Prevention sexually transmitted disease treatment guidelines. Clin Infect Dis 2011; 53 (suppl 3): S59-S63.
- Dastan D, Salehi P, Aliahmadi A, Gohari AR, Maroofi H, Ardalan A. New coumarin derivatives from *Ferula pseudalliacea* with antibacterial activity. Nat Prod Res 2016; 30(24): 2747-53.
- Majdi M, Dastan D, Maroofi H. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils of *Ballota nigra* Subsp. *kurdica* From Iran. Jundishapur J Nat Pharm Prod 2016; (In Press): e36314.
- Abdali E, Javadi S, Akhgari M, Hosseini S, Dastan D. Chemical composition and biological properties of *Satureja avromanica* Maroofi. J Food Sci Technol 2017; 54(3): 727-34.

- 9- Dastan D, Salehi P, Maroofi H. Chemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities on *Laserpitium carduchorum* Hedge & Lamond Essential Oil and Extracts During Various Growing Stages. *Chem Biodivers* 2016; 13(10): 1397-403.
- 10- Minaiyan M, Karimi F, Ghannadi A. Anti-inflammatory effect of *Pistacia atlantica* subsp. *kurdica* volatile oil and gum on acetic acid-induced acute colitis in rat. *RJP* 2015; 2(2): 1-12.
- 11- Sharifi MS, Hazell SL. GC-MS Analysis and Antimicrobial activity of the essential oil of the trunk exudates from *Pistacia atlantica kurdica*. *J Pharm Sci Res* 2011; 3(8): 1364-7.
- 12- Bozorgi M, Memariani Z, Mobli M, Salehi Surmaghi MH, Shams-Ardekani MR, Rahimi R. Five *Pistacia* species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, and *P. lentiscus*): A Review of Their Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology. *Sci World J* 2013; 2013: 219815.
- 13- Taran M, Mohebbali M, Esmaeli J. In Vivo Efficacy of Gum Obtained *Pistacia Atlantica* in Experimental Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *Iranian J Publ Health* 2010; 39(1): 36-41.
- 14- Azizian M, Pakzad I, Azizian R, Azizi Jalilian F, Taherikalani M, Sadeghifard N et al. Antibacterial Effect of Hydro-extract of *Pistacia atlantica* on Bacteria in In vitro. *Biomed Pharmacol J* 2013; 6(2): 133-6.
- 15- Roozegar MA, Azizi Jalilian F, Havasian MR, Panahi J, Pakzad I. Antimicrobial effect of *Pistacia atlantica* leaf extract. *Bioinformation* 2016; 12(1): 19-21.
- 16- Sharifi MS, Hazell SL. GC-MS Analysis and Antimicrobial activity of the essential oil of the trunk exudates from *Pistacia atlantica kurdica*. *J Pharm Sci Res* 2011; 3(8): 1364-7.
- 17- Rigane G, Ghazghazi H, Aouadhi C, Ben Salem R, Nasr Z. Phenolic content, antioxidant capacity and antimicrobial activity of leaf extracts from *Pistacia atlantica*. *Nat Prod Res* 2017; 31(6): 696-9.
- 18- Matini M, Rezaie S, Mohebbali M, Maghsood AH, Rabiee S, Fallah M, et al. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* Infection in Hamadan City, Western Iran. *Iran J Parasitol* 2012; 7: 67-72.
- 19- Clark CG, Diamond LS. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(3): 329-41.
- 20- Matini M, Maghsood AH, Mohebbali M, Rabiee S, Fallah M, Rezaie S, et al. In Vitro Susceptibility of Iranian Isolates of *Trichomonas vaginalis* to Metronidazole. *Iran J Parasitol* 2016; 11(1): 46-51.
- 21- Ghahremani-majd H, Dashti F, Dastan D, Mumivand H, Hadian J, Esna-Ashari M. Antioxidant and antimicrobial activities of Iranian mooseer (*Allium hirtifolium* Boiss) populations. *Hortic Environ Biotechnol* 2012; 53(2): 116-22.
- 22- Dunne RL, Dunn LA, Upcroft P, O'Donoghue PJ, Upcroft JA. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell Res* 2003; 13(4): 239-49.
- 23- Salehi L, Asghari G, Yousofi H, Yousofi-Darani H. The Effects of Different Extracts of *Viola Odorata* on *Trichomonas Vaginalis* in Culture Medium. *J Isfahan Med Sch* 2014; 31(266): 2139-48. (Persian)
- 24- Moon T, Wilkinson JM, Cavanagh HMA. Antiparasitic activity of two *Lavandula* essential oils against *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Hexamita inflata*. *Parasitol Res* 2006; 99(6): 722-8.



- 25- Calzada F, Yepez-Mulia L, Tapia-Contreras A. Effect of Mexican medicinal plant used to treat trichomoniasis on *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *J Ethnopharmacol* 2007; 113(2): 248–51.
- 26- Moraes MEA, Cunha GH, Bezerra MM, Fachine RV, Pontes AV, Andrade WS et al. Efficacy of the *Mentha crisper* in the treatment of women with *Trichomonas vaginalis* infection. *Arch Gynecol Obstet* 2012; 286(1): 125–30.
- 27- El-Sherbiny GM, El-Sherbiny ET. The Effect of *Commiphora molmol* (Myrrh) in Treatment of Trichomoniasis vaginalis infection. *Iran Red Crescent Med J* 2011; 13(7): 480-6.
- 28- Ertabaklar H, Kivcak B, Mert T, Ozensoy S. In vitro Activity of *Arbutus unedo* Leaf Extracts against *Trichomonas vaginalis* Trophozoites. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2009; 33(4): 263 -5.
- 29- Taran M, Rezaeian M, Izaddoost M. In vitro Antitrichomonas Activity of *Allium hirtifolium* (Persian Shallot) in Comparison with Metronidazole. *Iranian J Publ Health* 2006; 35(1): 92-4.
- 30- Hassani S, Asghari G, Yousefi H, Kazemian A, Rafieian M, Yousofi Darani H. Effects of different extracts of *Eucalyptus camaldulensis* on *Trichomonas vaginalis* parasite in culture medium. *Adv Biomed Res* 2013; 2: 47.
- 31- Naemi F, Asghari G, Yousofi H, Yousefi HA. Chemical composition of essential oil and anti trichomonas activity of leaf, stem, and flower of *Rheum ribes* L. extracts. *Avicenna J Phytomed* 2014; 4(3): 191-9.
- 32- Khanmohammadi M, Ganji S, Reyhani-Rad S. Anti-protozoan Effects of Methanol Extracts of the *Ferula szowitsiana* on the *Trichomonas vaginalis* Trophozoites in vitro. *IJWHRS* 2014; 2(5): 301–6.

## INVESTIGATION OF IN-VITRO EFFICACY OF PISTACIA ATLANTICA SUBSP. KURDICA EXTRACTS AGAINST TRICHOMONAS VAGINALIS

Mohammad Matini<sup>1\*</sup>, Samira Bakhtiarnjad<sup>2</sup>, Dara Dastan<sup>3, 4</sup>, Amir Hossein Maghsood<sup>5</sup>,  
Mohammad Fallah<sup>6</sup>

Received: 12 Feb, 2018; Accepted: 29 Mar, 2018

### Abstract

**Background & Aims:** Trichomoniasis is one of the most common non-viral sexually transmitted diseases worldwide that refractory trichomoniasis is increasing. The aim of this study was evaluation of extracts of *Pistacia atlantica* subsp. *Kurdica* against *Trichomonas vaginalis*.

**Materials & Methods:** The extracts of *P. atlantica* including n-hexane, ethyl acetate, methanol and hydroalcoholic were extracted by maceration. Five *T. vaginalis* isolates subjected to extract susceptibility testing using different concentrations consist of 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000 and 4000 µg/ml after 48 hrs incubation under aerobic condition and at 35.5 °C. Susceptibility test was performed in duplicate and repeated two times for each isolate.

**Results:** The extracts had potent activity against *T. vaginalis*. After 48 hrs incubation, the utmost activity was related to ethyl acetate and n-hexane extract with the lowest MIC of 125 µg/ml and mean MIC of 337 and 387 µg/ml, respectively. The minimum activity was related to methanolic and hydroalcoholic extract with the least MIC and mean MIC of 2000 µg/ml. The results of MLC and MIC tests were exactly compatible and they indicate the activity of the extracts on the parasites. The *T. vaginalis* isolates were susceptible to metronidazole, MICs ranged from 3.1 to 6.2 µg/ml and a mean of 4.2 µg/ml and a standard deviation of 1.5 µg/ml.

**Conclusions:** The results of this study showed that the ethyl acetate and n-hexane extract of *P. atlantica* have a significant activity against *T. vaginalis* parasite. Therefore, future studies are needed to identify the compounds of the extracts and their antimicrobial properties are evaluated in vivo and in vitro.

**Keywords:** Extract, Metronidazole, *Pistacia atlantica*, *Trichomonas vaginalis*

**Address:** Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

**Tel:** +988138380572

**Email:** matini@umsha.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2018; 29(3): 207 ISSN: 1027-3727

<sup>1</sup> Assistant Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran (Corresponding Author)

<sup>2</sup> MSc in Parasitology, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

<sup>4</sup> Medicinal Plants and Natural Products Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

<sup>5</sup> Associate Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

<sup>6</sup> Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran