دوره سیزدهم ـ شماره ۳ ـ پاییز ۱۳۹۶
10.22055/ivj.2017.45921.1669

تعیین تنوع ژنتیکی و حساسیت جدایه‌های *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* در برابر اثرات ضدقارچی عصاره‌ی اتانولی بنسرخ

سعید رزاقی‌خضرلو[۱]، عقیل شریف‌زاده[۲*]، مینو سلطانی[۳]، حجت‌اله شکری[۴] و علیرضا خسروی[۵]

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۲۶

خلاصه

درماتوفیت‌ها یک گروه از قارچ‌ها با خواص کراتینوفیلیک هستند. آن‌ها قادرند با تولید آنزیم‌های پروتئولیتیک مانند کراتیناز به اپیدرم به ویژه لایه‌ی شاخی تهاجم برند. *ترایکوفایتون* منتاگروفایتیس یک گونه درماتوفیتی شایع جهانی است. این گونه بر اساس ویژگی‌های ژنتیکی واریته‌های مختلفی دارد. در این مطالعه تنوع ژنتیکی ۲۰ جدایه‌ی بالینی *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* و حساسیت آن‌ها به عصاره‌ی اتانولی گیاه بنسرخ ارزیابی شدند. تنوع ژنتیکی جدایه‌ها با روش RAPD – PCR با استفاده از ۴ پرایمر OPN16، A08، OPD18 و R28 سنجش شد. سپس، حساسیت جدایه‌های *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* به عصاره‌ی بنسرخ با روش استاندارد میکرودایلوشن براث تعیین شد. مقادیر MIC جدایه‌ها بین ۶/۱ mg/ml و ۴۹/۳ mg/ml بودند (میانگین MIC: ۲۰/۳ mg/ml)، در حالی که مقادیر MFC جدایه‌ها بین ۲۴/۶ mg/ml و ۴۹/۳ بودند (میانگین MFC: ۴۰/۶ mg/ml). ۲۸ قطعه DNA تکثیر شده در واکنش RAPD-PCR به دست آمدند. بیش‌ترین قطعات DNA تکثیر شده (۹ باند) مربوط به پرایمر OPD18 بودند. پرایمر R28 کم‌ترین قطعات DNA تکثیر شده (۵ باند) را نشان داد. دندروگرام ترسیم شده ۳ گروه اصلی را بین ۲۰ جدایه‌ی *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* بر اساس تمام پرایمرها در فاصله‌ی ژنتیکی ۶۵ درصد شناسایی کرد. اکثر جدایه‌های *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* (۷۵ درصد) در گروه ۲ قرار گرفتند و ۱۰۰ درصد تشابه ژنتیکی فقط بین ۲ جدایه مشاهده شد. نتیجه‌گیری شد که تمام ژنوتیپ‌های *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* حساس به بنسرخ بودند. ارتباط بین حساسیت ضدقارچی و ژنوتیپ *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* ممکن است از اهمیت بالقوه‌ی درمانی برخوردار باشد و مطالعات گسترده‌تری برای اثبات این یافته ضروری هستند.

کلمات کلیدی: درماتوفیت، *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس*، حساسیت ضد قارچی، تنوع ژنتیکی، بنسرخ

مقدمه

درماتوفیت‌ها گروهی از قارچ‌ها هستند که شامل ۳ جنس *ترایکوفایتون*، *اپیدرموفایتون* و *میکروسپوروم* می‌باشند. این دسته از قارچ‌ها توانایی کلونیزه شدن در پوست و ضمایم آن را دارا هستند. جنس *ترایکوفایتون*، درماتوفیتی است که از خاک، بدن انسان و یا حیوانات جدا می‌شود. این قارچ قادر به هضم کراتین بوده و به داخل پوست نفوذ می‌کند و از عوامل ایجاد عفونت مو، پوست و ناخن در انسان‌ها و حیوانات مختلف می‌باشد (Khosravi 2008). در این جنس، گونه‌ی *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس*، درماتوفیتی است که هم گونه‌ی انسان‌گرا و هم حیوان‌گرا دارد. انواع حیوان‌دوست آن شامل واریته‌های *منتاگروفایتیس*، *کوئین‌کیانوم* و *ارینا‌سه‌ای* بوده و نوع انسان‌دوست شامل واریته‌ی *اینتردیجیتال* است. واریته‌ی *منتاگروفایتیس* عموماً در انسان ایجاد ضایعات التهابی کچلی سر، بدن، ناخن، ریش و سبیل می‌نماید (Khosravi 2009).

[۱] دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد قارچ شناسی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران
[۲*] استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران E-mail: asharifzadeh@ut.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)
[۳] دانش‌آموخته‌ی دکترای قارچ شناسی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران
[۴] دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل
[۵] استاد گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران

اگرچه مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها موجب بهبودی و برطرف شدن عوامل عفونی و عفونت می‌گردد، لیکن همین امر باعث پدیدار شدن میکروارگانیسم‌های مقاوم شده و از طرف دیگر ضعف و ناتوانی بیمار را به همراه دارند. در سال‌های اخیر تحقیق در مورد داروهای گیاهی به سرعت افزایش یافته و به منظور استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری‌ها، رابطه‌ی تنگاتنگی بین گیاه شناسان، داروسازان، شیمی‌دانان و میکروب شناسان ایجاد شده است (Martinez-Rossi et al. 2008, Sharifzadeh and Shokri 2016). گیاه بنسرخ (*Allium*) گیاهی است متعلق به خانواده‌ی لاله (Lilacea) که دارای استفاده‌های متعدد غذایی و دارویی است. گونه‌ی *Allium jesdianum* Boiss که در زبان محلی به نام بوسر، سرپا یا بنسرخ خوانده می‌شود گیاهی است پیازی و پایا، دارای ۳- ۲ برگ که در ارتفاعات غرب و جنوب غرب ایران می‌روید. این گیاه به طور سنتی برای درمان دردهای شکمی، روماتیسم، استفراغ، سنگ کلیه و سرماخوردگی استفاده می‌شود (Amiri 2007).

طبقه‌بندی مرسوم درماتوفیت‌ها ضرورتاً بر اساس خصوصیات مورفولوژی میکروسکوپی و تا حدی خصوصیات فیزیولوژی و تغذیه‌ای آن‌ها می‌باشد. ولی جستجوی این صفات عموماً کار آزمایشگاهی طولانی مدتی را لازم دارد و به علت مشترک بودن یک سری صفات فنوتیپی و تنوع و پلی‌مورفیسم در میان گونه‌های درماتوفیت، این شناسایی اختصاصی نبوده و نسبتاً غیرحساس است، زیرا سویه‌های قارچی در بیان صفات فنوتیپی مکرراً تغییر می‌کنند. امروزه روش‌های متنوع مولکولی پیشرفت کرده و جایگزین روش‌های سنتی (مثل تشخیص‌های میکروسکوپی و کشت) شده است. روش آنالیز آنزیمی محدودکننده (Restriction Enzyme Analysis) DNA میتوکندری تفاوت بین گونه‌ای (Intraspecies) جدایه‌های *ترایکوفایتون متاگروفایتیس* از نواحی مختلف جغرافیایی را معلوم کند (Mirzahoseini et al. 2009). در حالی که روش تکثیر اتفاقی DNA پلی-مورفیک (Random Amplified Polymorphic=RAPD)، هتروژنیسیتی موجود بین جدایه‌های *ترایکوفایتون متاگروفایتیس* را نشان می‌دهد (Kanbe 2008) . در مطالعات انجام شده معلوم شده است که ۲ واریته‌ی *ترایکوفایتون متاگروفایتیس* با استفاده از یک پرایمر RAPD از هم‌دیگر متمایز می‌شوند (Kim et al. 2001). براساس باندهای اختصاصی مشاهده شده، اطلاعات ارزشمندی نسبت به ساختار ژنتیکی واریته‌های مختلف ترایکوفایتون‌ها حاصل شده است . از RAPD-PCR به کرات در مطالعات اپیدمیولوژیک به منظور تشخیص عفونت‌های بیمارستانی نیز استفاده شده است. در مواردی تشخیص به موقع عامل از منبع عفونت (فرد یا شیئ)، در جلوگیری از شیوع بیماری نقش بسیار حیاتی ایفا می‌کند. در مواردی که این آزمایش در ارتباط با یک گونه یا جنس قارچی انجام می‌شود، باندهای ایجاد شده معرف جنس یا گونه بوده، لذا با توجه به اشکال متفاوت می‌توان از این داده‌ها جهت نشان دادن ارتباط فیلوژنیک استفاده نمود و آن را به صورت درخت فیلوژنیک نشان داد (Alipour and Mozafari 2013). این روش به لحاظ قدرت تفریق پذیری بالا، می‌تواند در همه‌گیری‌ها به منظور تفریق سویه‌های بسیار مشابه مورد استفاده قرار گیرد. نظر به سهولت، سرعت، حساسیت بالا و قدرت تفریق‌پذیری بالا، استفاده از این روش در آزمایشگاه‌ها و برای مطالعات اپیدمیولوژیکی و پایش قارچی مهم می‌باشد. در همین راستا به دلیل مطالعه‌ی تنوع ژنتیکی و اختلافات داخل گونه‌ای قارچ *ترایکوفایتون متاگروفایتیس*، به بررسی تایپینگ مولکولی جدایه‌های *ترایکوفایتون متاگروفایتیس* جدا شده در ایران به روش RAPD-PCR و اثر عصاره‌ی بنسرخ بر آن‌ها پرداخته شد.

مواد و روش کار

این پژوهش جمعاً بر روی ۲۰ جدایه‌ی بالینی *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* (جدا شده از گاو) تهیه شده از مرکز قارچ‌شناسی دانشگاه تهران از فروردین ماه ۱۳۹۳ تا آذر ماه ۱۳۹۳ صورت گرفت.

گیاه بنسرخ از ارتفاع ۲۲۰۰ متری منطقه‌ی سفید کوه خرم‌آباد جمع‌آوری گردید. گیاه در هرباریوم دانشکده‌ی کشاورزی لرستان کدگذاری شد. برگ‌های گیاه جدا و در معرض هوای جاری خشک شدند. برگ‌های خشک شده به وسیله‌ی آسیاب برقی پودر شدند. سپس ۵۰g از برگ‌های پودر شده در بشر حاوی ۳۰۰ml اتانول ۸۰ درصد به ۷۲ ساعت قرار داده شد. محتویات بشر ۲ بار در هر روز توسط همزن شیشه‌ای به هم زده می‌شد. بعد از گذشت مدت زمان مذکور، محتویات ظرف توسط کاغذ صافی فیلتر شد و محلول به دست آمده به دستگاه تبخیر در خلاء روتاری منتقل گردید. عمل تقطیر در خلاء با دمای ۴۰°C انجام گرفت. بعد از گذشت حدود ۴ ساعت، عصاره‌ی به دست آمده تا زمان استفاده در ۴°C- نگهداری شد (Hasanein and Gomar 2014).

جدایه‌های قارچی مورد آزمایش در محیط پوتیتو دکستروز آگار (مرک، آلمان) کشت داده شده و در انکوباتور یخچال‌دار، در دمای ۳۰°C به مدت ۲ هفته انکوبه شدند. بعد از ۲ هفته، 5ml از محلول سرم فیزیولوژی نرمال حاوی ۱۰µl توین ۸۰ به روی محیط آگار شیب‌دار اضافه و با سوآپ استریل کاملاً سطح کلنی‌های قارچی شست و شو داده شد. سوسپانسیون قارچی حاصل به مدت ۱۵ ثانیه به طور کامل ورتکس گردید و سپس به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در آزمایشگاه قرار داده شد تا میسیلیوم‌ها ته‌نشین شده و اسپورها در محلول باقی بماند. در ادامه غلظت سوسپانسیون با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰nm قرائت گردید و میزان جذب نوری قارچ *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* برابر ۰/۱۵-۰/۱۷تهیه شد تا غلظت سوسپانسیون برابر با ۲-۵×۱۰^{6}conidia/ml به دست آید. برای به دست آوردن غلظت نهایی ۲-۵×۱۰^{5} conidia/ml با کمک آب مقطر استریل رقت ۱:۱۰ تهیه شد و سوسپانسیون حاصل به عنوان سوسپانسیون نهایی برای انجام آزمون حساسیت دارویی استفاده گردید (Yang et al. 2009).

برای به دست آوردن وزن خشک عصاره‌ی بنسرخ، ml ۱ از آن خشک شد و وزن ۴۹/۳ mg/ml به دست آمد.

در این مطالعه برای سنجش حداقل غلظت مهارکننده‌ی رشد (MIC) از روش استاندارد میکرودایلوشن براث استفاده شد (CLSI 2008). در این روش از میکروپلیت-های ۹۶ خانه ته صاف استریل به همراه محیط کشت انیستیتو حافظه رزول پارک ۱۶۴۰ (RPMI1640) (مرک، آلمان) استفاده گردید. پایین‌ترین غلظتی که از رشد قارچ جلوگیری نمود به عنوان MIC ماده‌ی ضدقارچی در نظر گرفته شد. برای تعیین MIC ابتدا به هر یک از گوده‌های پلیت ۹۶ خانه به میزان ۱۰۰µl از محیط ۲ درصد RPMI1640 اضافه شد، سپس از محلول عصاره‌ی بنسرخ رقت‌های سریالی دو تایی در ۵ رقت به میزان ۱۰۰µl برای هر چاهک تهیه شد. بعد به هر یک از گوده‌ها به میزان ثابت ۱۰۰µl از سوسپانسیون استاندارد شده اضافه نموده تا حجم نهایی محلول برابر با ۲۰۰µl شود که با غلظت‌های عصاره‌ی آن متفاوت است. گوده‌ی ۱۰۰µl محیط و ۱۰۰µl سوسپانسیون قارچی به عنوان کنترل مثبت و گوده‌ی حاوی محیط کشت و عصاره‌ی بنسرخ به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند. این پلیت‌ها در دمای ۳۵°C به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. بعد از گذشت این زمان، رشد قارچی در میکروپلیت‌ها هم به صورت چشمی و هم توسط دستگاه الایزا ریدر با قرائت جذب در طول موج ۵۴۰nm بررسی شد. MFC کم‌ترین غلظتی از عصاره است که در آن غلظت ۹۹/۹ درصد از میکروارگانیسم‌ها از بین رفته باشند. برای تعیین MFC، با استفاده از سمپلر، از گوده MIC و گوده‌های قبل از MIC مقدار ۵۰µl میکرولیتر برداشت و بر روی محیط پوتیتو

دکستروز آگار به مدت یک هفته گرمخانه‌گزاری و حداقل غلظت کشنده‌ی عصاره مشخص گردید.

برای استخراج و تخلیص DNA از جدایه‌های قارچی، سویه‌های *ترایکوفایتون متاگروفایتیس* به طور جداگانه در حجم ۵۰ml از محیط کشت آبگوشت سابورو دکستروز (مرک، آلمان) به مدت ۲ هفته در حرارت ۳۰°C در داخل دستگاه شیکر انکوباتور با سرعت ۱۵۰rpm کشت داده شدند. مقدار ۰/۲-۰/۳g کلنی قارچی به یک میکروتیوب ۲ml منتقل و بر روی آن به اندازه‌ی ۳۰۰µl پرل شیشه‌ای افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه درون فریزر ۲۰- قرار داده و بعد به مدت یک دقیقه ورتکس شد. سپس مقدار ۵۰۰µl از بافر لیزکننده (400 mM Tris-HCl, pH 8.0; 60 mM EDTA;150 mM NaCl; 1% [SDS]; 40 mg/ml proteinase K) به نمونه افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید. دوباره به مدت یک دقیقه ورتکس انجام شد. نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در حرارت ۶۰°C انکوبه شدند و سپس ۱۰۰µl از سدیم پرکلرات به سوسپانسیون اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در حرارت ۶۰°C انکوبه گردید. پس از قرار دادن لوله‌ها بر روی یخ، ۵۰۰µl از کلروفرم سرد و ۵۰۰µl از فنل کلروفرم ایزوآمیل (pH=8, 24:24:1) و در نهایت ۵۰۰µl کلروفرم افزوده شد. سپس با اضافه کردن ۱۰۰۰µl اتانول سرد ۹۵ درصد و دو نوبت شستشو رسوب DNA با اتانول سرد ۷۰ درصد، رسوب روی کاغذهای مخصوص خشک و سپس در ۲۰۰µl از آب مقطر استریل به صورت معلق در لوله‌ی اپندورف میکروسانتریفیوژ حل گردید (Yang et al. 2009).

جهت آزمون RAPD-PCR از ۴ پرایمر ذکر شده در جدول ۱ که توسط شرکت تکاپو زیست طراحی شده است، استفاده گردید. ابتدا حجم هر واکنش به میزان ۲۰µl تعیین شد. هر واکنش حاوی DNA قارچی (۲µl)، آب مقطر (۱۳µl)، بافر ۱۰× (۲/۵µl)، کلرید منیزیوم (۰/۷۵µl)، dNTP (۰/۵µl)، پرایمر (۱µl) و DNA Taq پلیمراز (۰/۲۵µl) بود. واکنش PCR با شرایط زیر انجام شد: یک سیکل به مدت ۴ دقیقه در ۹۴°C در مرحله‌ی واسرشت اولیه، ۴۴ سیکل به مدت ۳۰ ثانیه در ۹۴°C در مرحله‌ی واسرشت، ۴۴ سیکل به مدت ۴۵ ثانیه در ۳۶°C در مرحله‌ی اتصال، ۴۴ سیکل به مدت ۷۵ ثانیه در ۷۲°C در مرحله‌ی همانندسازی و یک سیکل به مدت ۵ دقیقه در ۷۲°C در مرحله‌ی بسط نهایی. در هر آزمایش یک لوله فاقد DNA به عنوان کنترل منفی استفاده شد. قطعات DNA حاصل بر روی ژل آگاروز ۲ درصد (شرکت سیناژن، ایران) به مدت ۱ ساعت در ولتاژ ۷۰mA 1×TBE (89.2 mmol/l Tris، 89 mmol/l اسید بوریک و 0.5 mmol/l EDTA) قرار داده شده و جدا شد. سپس با رنگ اتیدیوم بروماید (0.5 µg/ml) رنگ‌آمیزی انجام شد. در نهایت محصول PCR زیر نور فرابنفش مورد مشاهده و عکس‌برداری شد. از مارکر ۱۰۰bp (کیاژن، ایران) جهت تعیین اندازه‌ی باندها و به عنوان نشانگر مورد استفاده قرار گرفت (Yang et al. 2009).

جدول ۱: توالی نوکلئوتیدی ۴ پرایمر انتخابی

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی
A08	GTG ACG TAG G
OPD18	GAG AGC CAA C
R28	ATG GAT CCG C
OPN16	CGC TGC TTC C

جهت تحلیل داده‌های مربوط به آزمایش حساسیت ضدقارچی از آزمون‌های توان دوم کای و دقیق فیشر و با کمک نرم‌افزار SPSS استفاده شد و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. آنالیز محصولات بر پایه‌ی وزن مولکولی باندها و حرکت آن‌ها در ژل الکتروفورز بررسی شد. به این ترتیب که باندهای ایجاد شده در هر نمونه به صورت اعداد ۰ و ۱ در جداول ماتریس وارد شد و با استفاده از برنامه‌ی NTSYS V. 2. 02، جدول ضریب تشابه و دندروگرام مربوط به نمونه‌های مورد بررسی ترسیم شد.

نتایج

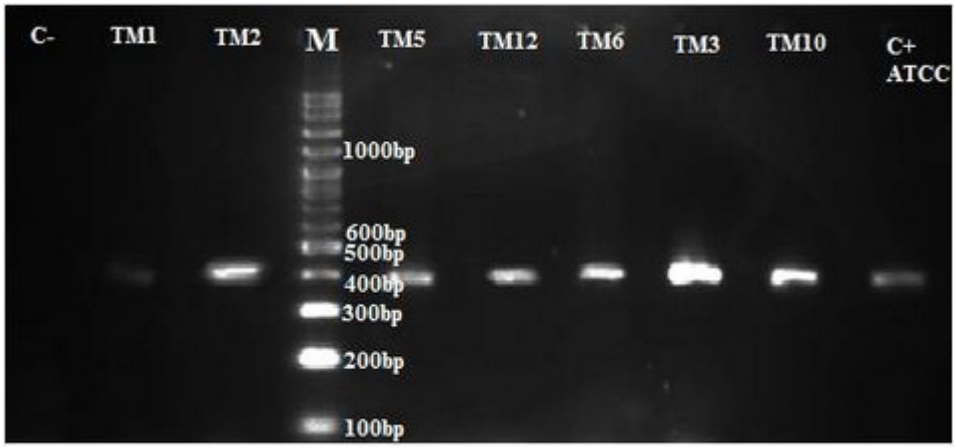
نتایج مربوط به MIC و MFC جدایه‌های تحت مطالعه در جداول ۲ و ۳ نشان داده شده است. میزان MIC جدایه‌ها بین ۶/۱mg/ml تا ۴۹/۳mg/ml و میانگین آن در بین جدایه‌ها ۱۲/۵mg/ml±۲۰/۳ به دست آمد. در حالی که میزان MFC جدایه‌ها بین ۲۴/۶mg/ml تا ۴۹/۳ و میانگین آن ۱۲/۴mg/ml±۴۰/۶ محاسبه شد. تفاوت‌های معنی‌دار آماری از نظر MIC بین جدایه‌های شماره ۵، ۷، ۱۵ و ۱۶ با سایر جدایه‌های *ترایکوفایتون متاگروفایتیس* مشاهده گردید ($p<0/05$).

جدول ۲: مقادیر MIC و MFC عصاره‌ی بنسرخ **بر جدایه‌های** *ترایکوفایتون متاگروفایتیس* **(TM)**

جدایه قارچی	MIC (mg/ml)	MFC (mg/ml)
TM_1	۲۴/۶	۴۹/۳
TM_2	۴۹/۳	۴۹/۳
TM_3	۲۴/۶	۴۹/۳
TM_4	۱۲/۳	۲۴/۶
TM_5	۶/۱	۲۴/۶
TM_6	۲۴/۶	۴۹/۳
TM_7	۶/۱	۲۴/۶
TM_8	۱۲/۳	۴۹/۳
TM_9	۱۲/۳	۴۹/۳
TM_{10}	۱۲/۳	۴۹/۳
TM_{11}	۲۴/۶	۴۹/۳
TM_{12}	۲۴/۶	۴۹/۳
TM_{13}	۲۴/۶	۴۹/۳
TM_{14}	۱۲/۳	۲۴/۶
TM_{15}	۶/۱	۲۴/۶
TM_{16}	۶/۱	۲۴/۶
TM_{17}	۲۴/۶	۲۴/۶
TM_{18}	۲۴/۶	۴۹/۳
TM_{19}	۴۹/۳	۴۹/۳
TM_{20}	۲۴/۶	۴۹/۳

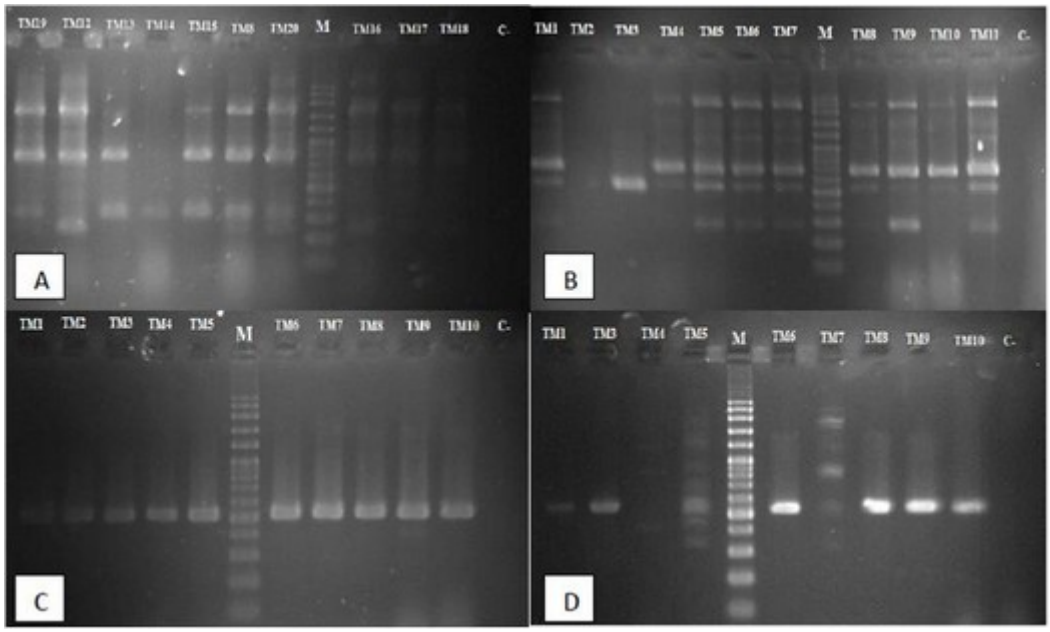
همان گونه که در تصویر ۱ نشان داده شده است به منظور تأیید تشخیص جدایه‌های *ترایکوفایتون متاگروفایتیس* از پرایمر CHS1 استفاده گردید. وزن مولکولی باند مورد نظر در این آزمون ۴۵۰bp بود. در این مطالعه از بین ۴ پرایمر استفاده شده، ۳ پرایمر OPN16, A08 و OPD18 باندهای واضح و تکرارپذیر را از خود نشان دادند (تصویر ۲). اما همان‌گونه که در تصویر ۲ (c) نشان داده شده است، پرایمر R28 تعداد کم‌تری باندهای واضح و تکرارپذیر را از خود نشان داد. با انجام واکنش RAPD-PCR در کل ۲۸ قطعه DNA تکثیر شده به دست آمد. بیش‌ترین تعداد قطعه تکثیر شده (۹ عدد) مربوط به پرایمر OPD18 و کم‌ترین تعداد (۵ عدد) مربوط به پرایمر R28 بود (جدول ۴).

به منظور محاسبه‌ی تنوع ژنتیکی ۲۰ جدایه‌ی بالینی *ترایکوفایتون متاگروفایتیس* از ماتریس فاصله‌ی ژنتیکی استفاده شد. نمونه‌های شماره ۱۲ و ۱۵ در کم‌ترین فاصله‌ی ژنتیکی (شباهت ۱۰۰ درصد) نسبت به هم و نمونه‌های ۱ و ۱۸ در دورترین فاصله‌ی ژنتیکی (شباهت ۳۳/۳ درصد) نسبت به هم قرار داشتند. پس از انتقال داده‌های مولکولی و ساخت ماتریس فاصله‌ی ژنتیکی، ماتریس ضریب تشابه برای هر یک از پرایمرها و نهایتاً برای مجموع پرایمرها رسم و سپس دندروگرام (درختچه-ی ژنتیکی) با استفاده از روش UPGMA به دست آمد (جداول ۵ و ۶ و تصویر ۳). دندروگرام ترسیم شده بر اساس مجموع پرایمرها در فاصله ژنتیکی ۶۵ درصد، ۳ گروه اصلی را بین ۲۰ جدایه‌ی *ترایکوفایتون متاگروفایتیس* مشخص کرد. گروه I خود به دو زیر گروه a شامل جدایه‌ی شماره ۱ و b شامل جدایه‌های ۷ و ۲۰ تقسیم شد، در حالی که گروه II به دو زیر گروه a' شامل جدایه‌های شماره ۳، ۹، ۱۰، ۱۴، ۱۹ و ۱۶و b' شامل جدایه‌های ۴، ۵، ۸، ۶، ۱۱، ۱۲، ۱۵، ۱۷ و ۱۸ تقسیم شد. گروه III شامل جدایه‌های شماره ۲ و ۱۳ بود (تصویر ۳).



تصویر ۱: PCR تشخیصی برخی از جدایه‌های *ترایکوفایتون متاگروفایتیس* با استفاده از پرایمر CHS1.

(M: مارکر، -C کنترل منفی و +C کنترل مثبت).



تصویر ۲: الگوی مولکولی جدایه‌ها با استفاده از روش RAPD-PCR.

(A: پرایمر OPD18، B: پرایمر OPN16، C: پرایمر R28 و D: پرایمر A08).

جدول ۳: فراوانی نسبی و مطلق MIC و MFC عصاره‌ی بنسرخ **بر** *ترایکوفایتون متاگروفایتیس* **در نمونه‌های مورد بررسی**

غلظت‌ها (mg/ml)	حداقل غلظت مهار رشد (MIC)		حداقل غلظت کشنده قارچ (MFC)	
	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی (٪)	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی (٪)
۴۹/۳	۲	۱۰	۱۳	۶۵
۲۴/۶	۹	۴۵	۷	۳۵
۱۲/۳	۵	۲۵	۰	۰
۶/۱	۴	۲۰	۰	۰
مجموع	۲۰	۱۰۰	۲۰	۱۰۰

جدول ۴: تعداد و فراوانی نسبی قطعات تکثیر شده‌ی DNA توسط پرایمرهای مورد مطالعه

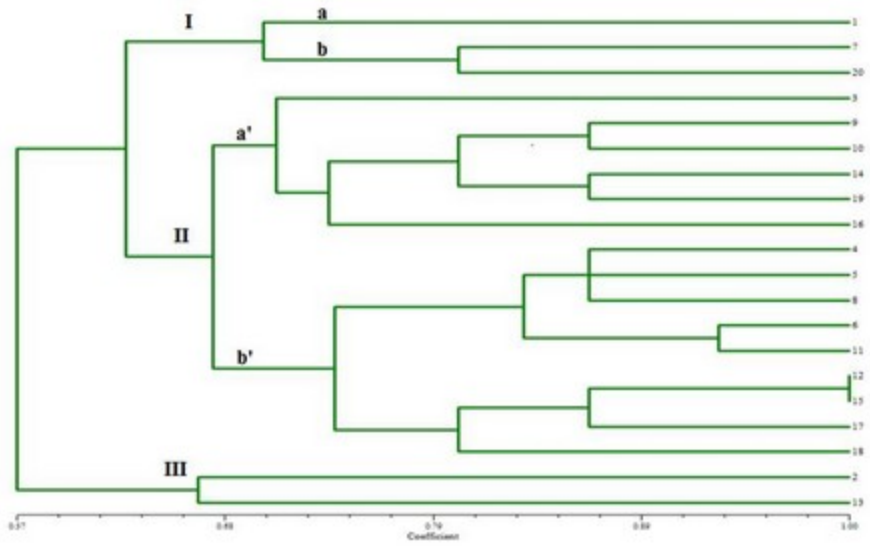
ردیف	کد پرایمر	توالی پرایمر	تعداد باندهای ایجاد شده	فراوانی نسبی (٪)
۱	OPN16	CGC TGC TTC C	۶	۲۱/۴۲
۲	R28	ATG GAT CCG C	۵	۱۷/۸۵
۳	A08	GTG ACG TAG G	۸	۲۸/۵۹
۴	OPD18	GAG AGC CAA C	۹	۳۲/۱۴
مجموع			۲۸	۱۰۰

جدول ۵: گروه‌های اصلی ۲۰ جدایه‌ی *ترایکوفایتون متاگروفایتیس* **بر اساس دندروگرام آغازگرها در فاصله ژنتیکی ۶۵ درصد**

گروه‌های اصلی	شماره‌ی جدایه‌ها	بیشترین میزان تشابه ژنتیکی
I	۱، ۷، ۲۰	۷ و ۲۰ (۸۰ ٪)
II	۳، ۹، ۱۰، ۱۴ ۱۹، ۱۶، ۴، ۵، ۸، ۶ ۱۱، ۱۲، ۱۵، ۱۷، ۱۸	۱۲ و ۱۵ (۱۰۰ ٪)
III	۲، ۱۳	۲ و ۱۳ (۶۶ ٪)

جدول ۶: ماتریس تشابه جدایه‌های *ترایکوفایتون متاگروفایتیس* **بر مبنای الگوی RAPD**

Genotypes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	1.00																			
2	0.533	1.00																		
3	0.600	0.667	1.00																	
4	0.667	0.467	0.800	1.00																
5	0.667	0.600	0.667	0.867	1.00															
6	0.667	0.600	0.667	0.867	0.867	1.00														
7	0.733	0.533	0.467	0.667	0.667	0.800	1.00													
8	0.667	0.467	0.667	0.867	0.867	0.867	0.667	1.00												
9	0.533	0.467	0.800	0.867	0.733	0.733	0.667	0.733	1.00											
10	0.667	0.467	0.667	0.733	0.600	0.600	0.667	0.600	0.867	1.00										
11	0.600	0.667	0.733	0.800	0.800	0.933	0.733	0.800	0.800	0.667	1.00									
12	0.533	0.600	0.667	0.867	0.733	0.867	0.667	0.733	0.733	0.600	0.800	1.00								
13	0.467	0.667	0.600	0.533	0.400	0.533	0.600	0.400	0.667	0.800	0.600	0.667	1.00							
14	0.467	0.667	0.733	0.667	0.667	0.533	0.600	0.533	0.800	0.800	0.600	0.533	0.733	1.00						
15	0.533	0.600	0.667	0.867	0.733	0.867	0.667	0.733	0.733	0.600	0.800	1.00	0.667	0.533	1.00					
16	0.467	0.400	0.733	0.800	0.667	0.667	0.600	0.800	0.800	0.667	0.600	0.667	0.600	0.733	0.667	1.00				
17	0.400	0.467	0.533	0.733	0.600	0.733	0.667	0.733	0.733	0.600	0.667	0.867	0.667	0.533	0.867	0.800	1.00			
18	0.333	0.667	0.600	0.667	0.667	0.667	0.600	0.533	0.800	0.667	0.733	0.800	0.733	0.733	0.800	0.600	0.800	1.00		
19	0.600	0.533	0.600	0.800	0.800	0.667	0.733	0.667	0.800	0.800	0.600	0.667	0.600	0.867	0.667	0.733	0.667	0.733	1.00	
20	0.667	0.467	0.667	0.733	0.600	0.733	0.800	0.600	0.733	0.600	0.667	0.733	0.533	0.533	0.733	0.667	0.733	0.667	0.667	1.00



تصویر ۳: الگوی خوشه‌بندی ۲۰ نمونه‌ی *ترایکوفایتون متاگروفایتیس* با روش RAPD-PCR بر اساس ماتریس جاکارد و الگوی خوشه‌بندی UPGMA و استفاده از ۴ پرایمر (A08, OPD18, OPN16, R28).

بحث

ترایکوفایتون متاگروفایتیس از اصلی‌ترین عوامل عفونت درماتوفیتی در حیوانات به خصوص گاو و گوسفند می‌باشد. تعداد داروهای مؤثر ضد درماتوفیتی بسیار محدود می‌باشند. این مسئله انتخاب پروتکل درمانی مؤثر و مناسب را اجتناب‌ناپذیر ساخته است. از آنجایی که اکثر داروهای ضدقارچ شناخته شده به دلیل تشابه ساختاری سلول‌های قارچ با سلول‌های پستانداران (یوکاریوت‌ها) دارای آثار جانبی گسترده به ویژه در مصرف مکرر و طولانی مدت می‌باشند، لذا استفاده از ترکیبات ضدقارچ طبیعی با منشاء گیاهی می‌توانند در مهار رشد عوامل قارچی بیماری‌زا حائز اهمیت فراوان باشند (Mercy et al. 2004, Kauffman et al. 2011). در همین رابطه در تحقیق حاضر آثار ضدقارچ عصاره‌ی بنسرخ بر روی جدایه‌های *ترایکوفایتون متاگروفایتیس* با استفاده از روش میکرودایلوشن براث مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه MIC عصاره‌ی بنسرخ در ۴۵ درصد از جدایه‌ها ۲۴/۶mg/ml و MFC عصاره‌ی اتانولی این گیاه در ۶۵ درصد از جدایه‌ها ۴۹/۳mg/ml محاسبه شد. در مطالعات مختلفی آثار ضدقارچ اسانس و عصاره‌های مختلف این گیاه در برابر گونه‌های مختلف درماتوفیت‌ها همچون *ترایکوفایتون روبروم*، *ترایکوفایتون متاگروفایتیس* و *میکروسپوروم کنیس* مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن‌ها همسو با نتایج این مطالعه می‌باشد (Amiri 2007, Aala et al. 2010, Mercy et al. 2014). محققین مختلف نشان دادند که مواد اصلی تشکیل دهنده‌ی اسانس و عصاره‌ی گونه‌های این جنس گیاهی شامل دی آلیل دی سولفید و دی آلیل تری سولفید است، از طرفی مشخص شده است که گونه‌هایی که دارای میزان بیش‌تری دی آلیل دی سولفید هستند اثرات ضدقارچی بیش‌تری دارند (Amiri 2007).

در این مطالعه تنوع ژنتیکی جدایه‌های *ترایکوفایتون متاگروفایتیس* با روش RAPD-PCR مورد مطالعه قرار گرفت. از آن جا که، جدایه‌های مختلف یک گونه قارچی می‌توانند از نظر بروز فاکتورهای حدت، توانایی تهاجم، بیماری‌زایی و همچنین حساسیت یا مقاومت به ترکیبات ضد قارچی متفاوت باشند، لذا روش‌های مولکولی مختلف به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی و طبقه‌بندی فیلوژنیک در قارچ‌ها ابداع شد. یکی از این روش‌ها به

کارگیری مارکرهای مولکولی است که یکی از شایع‌ترین آن‌ها، مارکرهای مولکولی RAPD می‌باشد . روش RAPD-PCR به عنوان یک روش دقیق و آسان جهت شناسایی تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های مختلف شناخته شده است. این روش دارای مزایای بسیاری است که از آن جمله می‌توان به بکارگیری مقادیر کم DNA، عدم نیاز به طراحی پرایمر اختصاصی و سریع‌تر بودن آن اشاره کرد. در این مطالعه در گروه‌بندی انجام شده به روش UPGMA جدایه‌های *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* به ۳ گروه اصلی I، II و III تقسیم‌بندی شدند و گروه‌های اصلی I، II هر یک ۲ زیر گروه را در بر می‌گرفتند. از طرفی اکثر جدایه‌های تحت مطالعه در گروه اصلی II قرار داشتند (۷۵ درصد–۱۵جدایه) و گروه III تنها شامل ۲ جدایه شماره ۲ و ۱۳ بود. Khosravi و همکاران در سال ۲۰۱۲، روش RAPD-PCR را به عنوان یک روش مناسب و آسان جهت شناسایی و تایپینگ سریع گونه‌های درماتوفیت مخصوصاً *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* معرفی کردند و با جداسازی *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* از حیوانات اگزوتیک مانند ایگوآنا، دامنه‌ی گسترش این گونه را بیش‌تر از موارد شناسایی‌شده توجیه کرده و اظهار داشتند که با توجه به گستردگی میزبانی این قارچ، ضروری است که با رعایت نکات بهداشتی در حیوانات خانگی و اگزوتیک از بروز موارد زئونوز جلوگیری شود. Mirhendi و همکاران در سال ۲۰۰۹، در مطالعه‌ای بر روی شناسایی و افتراق *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* و *ترایکوفایتون روبروم* نشان دادند که علی‌رغم هزینه‌های بالاتر روش‌های مبتنی بر DNA، این روش از قاطعیت و سرعت بسیار بالاتری جهت افتراق *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* از سایر گونه‌ها مخصوصاً *ترایکوفایتون روبروم* دارد . Emilie و Marion در سال ۲۰۰۷، در مطالعه‌ای روی *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس‌های* جدا شده از نمونه‌های انسانی و حیوانی نشان دادند که در بین نمونه‌های جدا شده از میزبان‌های مختلف، یک ارتباط معنی‌داری از لحاظ توالی ژنومی ویژه‌ی آنزیم MnSOD وجود دارد که می‌تواند راه‌کار مناسبی جهت دسته‌بندی و تاکسونومی گونه‌های مختلف *ترایکوفایتون* باشد. Yazdanparast و همکاران در سال ۲۰۰۹، با استفاده از سوش‌های چندگانه‌ی *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* جدا شده از بیماران مبتلا به درماتوفیتوزیس مراجعه کننده به بیمارستان دانشگاه علوم پزشکی ایران به کمک روش RAPD-PCR، تفاوت سوش‌های مختلف را ارزیابی و نشان دادند که پراکندگی واریته‌های *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* از الگوی معینی پیروی نموده و این توزیع با مطالعات قبلی مخصوصاً مطالعاتی که در کشور انگلستان انجام شده شباهت زیادی دارد و روش RAPD-PCR قادر است به بسیاری از سؤالات و مشکلات موجود در زمینه‌ی درمان بیماری‌های درماتوفیتی پاسخ دهد. Spesso و همکاران در سال ۲۰۱۳، با استفاده از روش RAPD-PCR تنوع ژنتیکی ۳۴ نمونه‌ی بالینی *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* جدا شده از ۳۸ بیمار آرژانتینی را ارزیابی کرده و بیان می‌کنند که این گونه‌ها الگوی پلی‌مورفیسم نسبتاً مشابهی داشتند که در اغلب جدایه‌ها تکرار شده بودند. این مطالعه تأکید می‌کند که RAPD-PCR می‌تواند یک روش کاربردی موفق جهت تعیین تنوع ژنتیکی گونه‌های *ترایکوفایتون* باشد (Spesso et al. 2013). Mochizuki و همکاران در سال ۱۹۹۷، طی تحقیقی بر روی *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* با استفاده از روش RAPD-PCR و توسط ۵ پرایمر ۱۰ نوکلئوتیدی توانستند به طور واضح آن‌ها را از هم تفکیک نمایند . پلی‌مورفیسم داخل گونه‌ای اندکی هم مابین جدایه‌های واریته‌ی *اینتردیجیتال ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* دیده شده است. وی و همکارانش طی تحقیقی دیگر در همان سال (۱۹۹۷) توسط پرایمری با توالی الیگونوکلئوتیدی تصادفی GAGCCCGACT - 5¹ 3¹ - توسط روش RAPD-PCR نشان دادند که به راحتی می‌توان دو واریته‌ی *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* (واریته‌ی *اینتردیجیتال* و واریته‌ی *منتاگروفایتیس*) را توسط الگوهای مشخص و متفاوت باندهای DNA شان، از هم تفکیک

نمود. محققین پیشنهاد می‌نمایند به علت دقت و سرعت بالای این روش، از RAPD-PCR می‌توان به عنوان یک وسیله‌ی دقیق آزمایشگاهی در تشخیص درماتوفیتوزیس انسان استفاده کرد (Kanbe 2008).

در این تحقیق، تایپینگ به روش RAPD-PCR و با ۴ پرایمر A08، R28، OPD18 و OPN16 و با هدف ارزیابی تنوع ژنتیکی بر روی ۲۰ جدایه‌ی بالینی *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* انجام گرفت و با هر دو پرایمر ۱۰ پروفایل شناسایی گردید. میانگین MIC گیاه بنسرخ در گروه‌های فیلوژنیک اول و دوم معادل ۱۸/۴mg/ml بود، در حالی که میانگین MIC گیاه بنسرخ در گروه سوم معادل ۳۶/۹mg/ml محاسبه گردید. نتایج نشان داد که اثر عصاره‌ی گیاه بنسرخ بر روی گروه‌های فیلوژنیکی اول و دوم مشابه است، در حالی که در گروه سوم عصاره‌ی این گیاه با غلظت بیش‌تری کارآمد است. در روش RAPD-PCR به دلیل آن که پرایمرها تصادفی بوده و بر مبنای توالی هدف طراحی نگردیده است در صورتی که الگوهای ما متفاوت مشاهده شوند این تفاوت می‌تواند قابل استناد باشد. البته لازم به ذکر است که گفته شود آزمون RAPD-PCR بسیار حساس به واکنش‌گرها و شرایط واکنش است. به نظر می‌رسد در صورت تنظیم بودن شرایط، این روش تکرارپذیری خواهد داشت. شاید یکی از علت‌های تکرارناپذیری این آزمون در پژوهش‌ها، عدم تنظیم دقیق واکنشگرها، پیپت نمودن نامناسب، کالیبره نبودن ترموسایکلر و حتی خود شخص محقق باشد. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد آزمون RAPD-PCR هرچند یک روش ساده، قابل اجرا و معمول در کشوری مانند ایران و قابل استفاده در مطالعات اپیدمیولوژیک و پایش و تعقیب همه‌گیری می‌باشد ولی ثابت نگه داشتن شرایط دما، زمان، واکنش‌گرها در این آزمون از اصول کار می‌باشد و در صورتی نتایج قابل ارزش می‌باشد که همه این شرایط رعایت گردد. توصیه می‌شود این روش، در جمعیت‌های مختلف اعم از بیمار و سالم مورد بررسی قرار گیرد تا اهمیت این روش، بیش‌تر و بهتر مشخص گردد. بنابراین انجام این آزمون‌های ساده، در مراکز درمانی و بیمارستان‌ها توصیه می‌گردد. همچنین استفاده از گیاهان دارویی در کنار داروهای شیمیایی به عنوان مکمل درمان، جهت جلوگیری از مقاومت‌های دارویی و تکمیل دوره‌های درمانی توصیه می‌گردد. در انتها پیشنهاد می‌شود تعداد بیش‌تری از جدایه‌های *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* با استفاده از پرایمرهای متنوع‌تر و با تعداد بیش‌تر الگوی به دست آمده از DNA مورد بررسی قرار گیرند تا بتوان با روش RAPD-PCR به یک الگوی اختصاصی برای نمونه‌های تیپیک و آتیپیک و همچنین برای هر یک از جدایه‌های *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* بر اساس میزبان دست یافت.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تهران برای پشتیبانی مالی این مطالعه قدردانی می‌نمایند.

منابع

Aala, F.; Yusuf, U.K.; Khodavandi, A. and Jamal, F. (2010). In vitro antifungal activity of allicin alone and in combination with two medications against six dermatophytic fungi. African Journal of Microbiology Research, 4 (5): 380-385.

Alipour, M. and Mozafari, N.A. (2015). Terbinafine susceptibility and genotypic heterogeneity in clinical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* by random amplified polymorphic DNA (RAPD). Journal De Mycologie Medicale, 25 (1): 1-9.

Amiri, H. (2007). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Allium jesdianum* Boiss. & Buhse from Iran. Journal of Medicinal Plants, 1 (3): 39-44.

Amiri, H. (2007). Identification of chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and different extracts of *Allium jesdianum*. Journal of Medicinal Plants, 6: 39-44.

Emilie, E. and Marion, R. (2007). Phylogenetic analysis of *Trichophyton mentagrophytes* human and animal isolates based on MnSOD and ITS sequence comparison. Microbiology, 153 (10): 3466-3477.

John, H.R.; Mahmood, A.G. (2008). Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard, 2nd ed, CLSI document M38-A2, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Hasanein, P. and Gomar, A. (2014). Effects of *Zingiber officinale* Rosc. hydroethanloic extract on antinociception induced by hyoscine in male rats. Journal of Medicinal plants, 2 (50): 172-179.

Kanbe, T. (2008). Molecular approaches in the diagnosis of dermatophytosis. Mycopathologia, 166 (5-6): 307-317.

Kauffman, C.A.; Pappas, P.G.; Sobel, J.D. and Dismukes, W.D. (2011). Essentials of Clinical Mycology. 2nd ed., London, UK: Springer Science Business Press, Pp: 207-209.

Khosravi, A.R. (2008). Fungal infections and immune responses. 1st ed. Tehran, Iran: Tehran University Press, Pp: 34-38.

Khosravi, A.R. (2009). Medical Mycology, A practical approach. 2nd ed. Tehran, Iran: Jahad-e-Daneshgahi of Tehran Press, P: 56-59.

Khosravi, A.R.; Shokri, H.; Rostami, A.; Tamai, I.A.; Erfanmanesh, A. and Memarian, I. (2012). Severe dermatophytosis due to *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* in flocks of green iguanas (*Iguana iguana*). Journl of Small Animal Practice, 53: 286-291.

Kim, J.A.; Takahashi, Y.; Tanaka, R.; Fukushima, K.; Nishimura, K. and Miyaji, M. (2001). Identification and subtyping of *Trichophyton mentagrophytes* by random amplified polymorphic DNA. Mycoses, 44 (5):157-165.

Martinez-Rossi, N.M.; Peres, N.T.A. and Rossi, A. (2008). Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. Mycopathologia, 166 (5-6): 369-383.

Mercy, K.A.; Ijeoma, I. and Emmanuel, K.J. (2014). Anti-dermatophytic activity of garlic (*Allium sativum*) extracts on some dermatophytic fungi. International Letters of Natural Sciences, 19: 34-40.

Mirhendi, H.; Nooripour Sisakhet, S.; Shidfar, M.R.; Zaini, F.; Jalalizand, N. and Tavakoli, F. (2009). Identification and differentiation of *Trichophyton Mentagrophytes* and *T. rubrum* by polymerase chain reaction and enzymatic digestion. Ofogh Danesh, 13: 39-48.

Mirzahoseini, H.; Omidinia, E.; Shams-Ghahfarokhi, M.; Sadeghi, G. and Razzaghi-Abyaneh, M. (2009). Application of PCR-RFLP to rapid identification of the main pathogenic dermatophytes from clinical specimens. Iranian Journal of Public Health, 38 (1): 18-24.

Mochizuki, T.; Sugie, N. and Uehara, M. (1997). Random amplification of polymorphic DNA is useful for the differentiation of several onthropophlic dermatophytes. Mycoses, 40 (11-12): 405-409.

Spesso, M.F.; Nuncira, C.T.; Burstein, V.L.; Masih, D.T.; Dib, M.D. and Chiapell, L.S. (2013). Microsatellite-primed PCR and random primer amplification polymorphic DNA for the identification and epidemiology of dermatophytes. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 32 (8): 1009-1015.

Sharifzadeh, A. and Shokri, H. (2016). Antifungal activity of essential oils from Iranian plants against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida albicans*. Avicenna Journal of Phytomedicine, 6 (2): 215-222.

Yang, X.; Sugitac, T.; Takashimad, M.; Hirumae, M.; Li, R. and Sudoa, H. (2009). Differentiation of *Trichophyton rubrum* clinical isolates from Japanese and Chinese patients by randomly amplified polymorphic DNA and DNA sequence analysis of the non-transcribed spacer region of the rRNA gene. Journal of Dermatological Science, 54 (1): 38-42.

Yazdanparast, S.A.; Rahimi, H. and Farnoodian, M. (2009). Molecular strain typing of *Trichophyton mentagrophytes* isolated from patients with dermatophytosis by random amplified polymorphic DNA. Journal of Iran University Medical Sciences, 16 (66): 36-42.

Determination of genetic diversity and susceptibility of *Trichophyton mentagrophytes* isolates against antifungal effects of ethanolic extract of *Allium jesdianum*

Razzaghi Khezezlo, S.[1]; Sharifzadeh, A.[2]; Soltani, M.[3]; Shokri, H.[4] and Khosravi, A.[5]

Received: 15.03.2016 Accepted: 16.11.2016

Abstract

Dermatophytes are a group of fungi with keratinophilic properties. They are able to invade epidermis, especially stratum corneum, by the production of proteolytic enzymes such as keratinase. *Trichophyton mentagrophytes* (*T. mentagrophytes*) is a common cosmopolitan dermatophyte species. This species has different varieties based on genetic characteristics. In this study genetic diversity of 20 clinical isolates of *T. mentagrophytes* and their susceptibility to ethanolic extract of *Allium jesdianum* (*A. jesdianum*) were evaluated. Genetic diversity of the isolates was assessed by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) method using 4 primers including OPN16, A08, OPD18 and R28. Then, susceptibility of *T. mentagrophytes* isolates to *A. jesdianum* extract was determined by standard microdilution broth method. The MIC values of the isolates were between 6.1 and 49.3 mg/ml (mean MIC: 20.3 mg/ml), whereas the MFC values of the isolates were between 24.6 and 49.3 mg/ml (mean MFC: 40.6 mg/ml). Twenty eight propagated DNA fragments were achieved in RAPD-PCR reaction. The most propagated DNA fragments (9 bands) were related to the OPD18 primer. The R28 primer showed the least propagated DNA fragments (5 bands). Drawn dendrogram identified 3 main groups among 20 *T. mentagrophytes* isolates according to all primers in 65% genetic distance. Most of *T. mentagrophytes* isolates (75%) were placed in group 2 and 100% genetical similarity was only seen between 2 isolates. It was concluded that all *T. mentagrophytes* genotypes were susceptible to *A. jesdianum*. The correlation between antifungal susceptibility and *T. mentagrophytes* genotype may be of potential therapeutic significance and larger studies are needed to prove this finding.

Key words: Dermatophyte, *Trichophyton mentagrophytes*, Antifungal susceptibility, Genetic variation, *Allium jesdianum*

1- MSc Graduated of Mycology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
3- Phd Graduated of Mycology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
4- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran
5- Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
Corresponding Author: Sharifzadeh, A., E-mail: asharifzadeh@ut.ac.ir