مقایسه اثر اسانس آویشن و میخک با فلوکونازول و نیستاتین بر ایزوله های بالینی کاندیدا آلبیکنس

علیرضا داشی پور[۱]، ناصر کیخا*[۲]، مهدیه مودی[۳]، فرشید کشاورزی[۴]، مهسا درگاهیان[۵]

۱- استادیار علوم و صنایع غذایی، مرکز تحقیقات ارتقاء سلامت، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.
۲-استادیار قارچ شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، پژوهشکده سل مقاوم به درمان، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.
۳-کارشناس ارشد ژنتیک پزشکی، مرکز تحقیقات ژنتیک در بیماری های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.
۴-کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، پژوهشکده سل مقاوم به درمان، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.
۵-دانشجوی دکترای حرفه ای پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

***نشانی برای مکاتبه:** دانشگاه علوم پزشکی زاهدان- دانشکده پیراپزشکی- صندوق پستی ۹۸۱۶۸۷۴۳۴۶۵، تلفن: ۰۵۴۳۳۲۹۵۷۴۵، Nasserkeikha@yahoo.com

دریافت مقاله: خرداد نود و هفت پذیرش برای چاپ: مرداد نود و هفت

چکیده

سابقه و هدف: *با توجه به افزایش روزافزون مقاومت های دارویی کاندیدا آلبیکنس به داروهای ضد قارچی موجود و از طرفی استقبال مردم از داروهای گیاهی لزوم استفاده از ترکیبات گیاهی دارای خاصیت ضد قارچی را اجتناب ناپذیر ساخته است. این مطالعه با هدف مقایسه اثر ضد قارچی اسانس های آویشن و میخک در مقایسه با داروهای فلوکونازول و نیستاتین علیه ایزوله های بالینی کاندیدا آلبیکنس در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت.*

روش کار: *شناسایی ایزوله های بالینی کاندیدا آلبیکنس با روش های فنوتیپی و ژنوتیپی انجام شد. برای بررسی اثر ضد قارچی هرکدام از اسانس ها و داروها از پروتکل M27-A3 توصیه شده توسط موسسه بین المللی آزمایشگاه بالینی استفاده شد و حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد و حداقل غلظت کشندگی تعیین گردید.*

یافته ها: *حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد ایزوله های بالینی برای اسانس های آویشن و میخک به ترتیب ۰/۰۰۳ و ۰/۴۷ میکرولیتر در میلی لیتر بدست آمد. MIC داروی نیستاتین در محدوده IU/ml ۹/۲-۵/۳۷ و MIC داروی فلوکونازول علیه ایزوله های بالینی کاندیدا آلبیکنس در غلظت ۱۲/۵-۳/۱۲ میکروگرم در میلی لیتر تعیین شد.*

نتیجه گیری: *یافته های حاصل از این مطالعه نشان داد که اسانس های آویشن و میخک به ترتیب در مقایسه با داروهای فلوکونازول و نیستاتین فعالیت ضد قارچی بیشتری علیه ایزوله های بالینی کاندیدا آلبیکنس دارند. با توجه به نتایج مطالعه حاضر اسانس های آویشن و میخک برای کنترل ولوواژنیت کاندیدیایی توصیه می شود.*

واژگان کلیدی: اسانس آویشن، اسانس میخک، کاندیدا آلبیکنس، فلوکونازول

مقدمه

در طول زندگی سه چهارم از جمعیت زنان در معرض ابتلا به ولوواژنیت کاندیدیایی هستند و کاندیدا آلبیکنس عامل ۸۰ درصد موارد بیماری است(۱ و ۲). کاندیدا آلبیکنس به عنوان دومین عامل در ایجاد عفونت های قارچی فرصت طلب و بیماری های حاد، تحت حاد و مزمن می تواند نقش مهمی داشته باشد و از طریق کلنیزاسیون در قسمت مختلف بدن ایجاد بیماری نماید. در موارد نادری و بخصوص در مراحل آخر بیماری های ناتوان کننده سیستم ایمنی، در معتادان به مواد مخدر، جراحی ها، استفاده از کاتترهای داخل وریدی، دریچه‌های مصنوعی قلب، شانت های مایع مغزی نخاعی و سوندهای ادراری می تواند باعث ایجاد عفونت سیستمیک و خطرناکی همچون اندوکاردیت، مننژیت و کاندیدمیا شود که در اغلب موارد کشنده است(۳ و ۴).

با توجه به این مهم که قارچ ها ارگانیسم هایی یوکاریوت می باشند و درمان با داروهای ضد قارچ شیمیایی سلول های بیمار را هم تحت تاثیر قرار می دهد. از سوی دیگر وجود محدودیت هایی در درمان بیماری های قارچی از قبیل کمبود و گرانی داروهای ضد قارچی، عوارض جانبی آن ها و نیز گسترش مقاومت های دارویی آزول در میان استرین های کاندیدا آلبیکنس به عنوان یک مشکل مهم پزشکی، توجه پژوهشگران به داروهای ضد قارچی جدید بویژه داروهای گیاهی شده است(۵ و ۶)، ازجمله این مواد دارویی که می

تواند مورد مصرف انسان قرار گیرد و دارای حداقل اثر جانبی باشند، اسانس های گیاهی می باشند. اسانس ها به دلیل دارا بودن ترکیبات منحصر به فرد خود توانایی مقابله علیه طیف گسترده ای از میکروب ها، تک یاخته ها و حشرات را دارا می باشند(۷ و۸).

گیاه آویشن با نام علمی (Thymus vulgaris) یکی از گیاهان تیره نعناعیان (Lamiaceae) است که در نواحی مختلف مدیترانه و برخی نواحی آسیا می روید و امروزه در مناطق مختلف جهان و از جمله در ایران کشت و تولید می شود. آویشن محتوی ۰/۸تا ۲/۶ درصد (معمولاً ۱ درصد) اسانس است که قسمت اعظم آنرا فنل ها، هیدروکربن های مونوترپنی و الکل ها تشکیل می دهند. تیمول جزء اصلی ترکیبات فنلی در گیاه آویشن است. اسانس آویشن از جمله ده اسانس معروف می باشد که جایگاه خاصی در تجارت جهانی دارد(۹ و ۱۰).

گیاه میخک از خانواده .Myrtus cummunis L می باشد که حاوی ۲۱-۱۴ درصد اسانس است. اسانس میخک حاوی ۸۰-۷۰ درصد از یک ترکیب فنلی به نام اوگنول است که خاصیت آنتی اکسیدانی دارد(۱۱). اسانس ها فعالیت های ضد میکروبی گسترده ای دارند و در بسیاری از موارد سبب از بین بردن باکتریها، قارچ ها و ویروس ها می شوند، بدون اینکه اثرهای نامطلوبی بر سلامت مصرف کننده داشته باشند. عمده ترین ترکیبات شیمیایی مشترک در اسانس های گیاهی شامل تیمول، آلفا پینن، بتا پینن، کارواکرول، لینالول، ژرماکرن و کومین آلدهید می باشد(۱۲).

اسانس آویشن و میخک دو اسانس با اثرات قابل توجه ضد میکروبی هستند(۱۳ و ۱۴). در قرن نوزده و بیست استفاده از اسانس ها در پزشکی گسترش چشمگیری داشته و مقدار استفاده ازآن بعد از مصارف طعم و رایحه، درمقام دوم قراردارد(۱۵)، بیشترین استفاده از اسانس ها در اروپا شامل استفاده از آنها در غذا، عطرها و داروها است. البته در رایحه درمانی هم از اسانس ها استفاده می‌شود(۱۶).

از خصوصیات ضد میکروبی اسانس ها در تولید برخی از محصولات مانند پرکننده های کانال دندان(۱۷)، ضدعفونی کننده ها و مکمل های غذایی در تغذیه دام برای افزایش شیر دهی استفاده شده است(۱۶ و ۱۸). با توجه به محدودیت استفاده از داروهای ضد قارچی مناسب و مؤثر و افزایش عفونت های کاندیدایی و افزایش مقاومت های دارویی و نیاز به کشف عوامل جدید و بهتر برای درمان عفونت های با عامل کاندیدا آلبیکنس این مطالعه با هدف مقایسه اثر اسانس های آویشن و میخک با داروهای فلوکونازول و نیستاتین بر ایزوله های بالینی کاندیدا آلبیکنس در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

روش کار

در این مطالعه تجربی به روش غیر تصادفی از بیماران مشکوک به بیماری ولوواژینیت که دارای علائمی چون خارش، سوزش، قرمزی، ترشحات پنیری شکل بودند، طی یک دوره ده ماهه پس از کسب رضایت، نمونه برداری صورت گرفت. در این مطالعه از سویه استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* ATCC10231 استفاده شد. اسانس های آویشن و میخک از شرکت باریج اسانس خریداری شد و در ظروف تیره نگهداری گردید. همچنین از داروی فلوکونازول (داروسازی امین، ایران) و نیستاتین واژینال (شرکت پارس دارو، ایران) در این تحقیق استفاده شد. پس ار آماده سازی محیط کورن میل آگار محتوی توئین۸۰ (شرکت مرک آلمان)، ازکلنی های مخمری تازه رشد یافته در محیط سابورودکستروزآگار با یک آنس استریل برداشت نموده و به صورت شیارهای کم عمق و موازی در محیط فوق کشت داده شد. سپس لامل استریل بر روی محل تلقیح در سطح محیط کشت قرار داده شد. پلیت ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه گردید و پس از طی زمان انکوباسیون پلیت ها در محل تلقیح از نظر وجود کلامیدوکونیدی (کلامیدوسپور) مورد بررسی قرار گرفتند.

در آزمایش تولید لوله زایا (Germ Tube) توسط یک آنس استریل از کلنی تازه رشد یافته در محیط سابورودکستروز آگار برداشت شد و در لوله های حاوی ۰/۵ میلی لیتر سرم جنین گوساله تلقیح گردید، سوسپانیون حاصل به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از آن قطره ای از سوسپانسیون توسط پی پت پاستور روی لام قرار گرفت و در زیر میکروسکوپ بررسی شد.

مقدار ۴۷/۷ گرم از پودر محیط کشت کروم آگار کاندیدا (کروم آگار، فرانسه) در یک لیتر آب مقطر به کمک حرارت تا دمای جوش گرم شد تا بطور کامل حل شود. بعد از اینکه در دمای به حدود ۵۵ درجه سانتی گراد رسید، در زیر هود و شرایط استریل در مجاورت شعله آتش در ظروف پتری دیش پخش شدند و بعد از سرد شدن تا زمان استفاده در یخچال نگهداری گردید. روش تلقیح به صورت ایزولاسیون چند مرحله ای بود تا کلنی های تک و ایزوله در محیط بدست آید. پس از کشت در محیط فوق به مدت ۴۸ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه و رنگ کلنی ها مورد مطالعه قرار گرفت. از سویه استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* (ATCC10231) که بر روی محیط کروم آگار کاندیدا رنگ سبز روشن ایجاد می کند به عنوان کنترل مثبت و از کاندیدا کروزئی که در محیط کروم آگارکاندیدا رنگ صورتی تیره ایجاد می کند به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

جهت تشخیص سویه‌های *کاندیدا* واکنش PCR با استفاده از جفت پرایمرهای ITS1 و ITS4 با توالی های Forward: TCCGTAGGTGAACCTGCG و Reverse: TCCTCCGCTTATTGATATGC انجام شد. طبق پروتکل کیت Master Mix شرکت Thermo (جدول ۱) برنامه واکنش PCR بر اساس جدول ۲ صورت گرفت.

جدول ۱- ترکیب مواد استفاده شده در واکنش PCR

مواد	مقدار (میکرولیتر)
Master Mix	۱۲/۵
Primer,F	۱/۵(۱۰ Pmol)
Primer,R	۱/۵ (۱۰ Pmol)
Template DNA	۱(۵۰ng)
H2O	۸/۵
حجم نهایی	۲۵

گرادیانت دمایی۶۰-۵۵ درجه سانتی‌گراد جهت بهینه نمودن شرایط PCR انجام شد و برای پرایمرها مطلوب‌ترین دمای اتصال به DNA الگو به دست آمد و طبق جدول ۲-۴ برنامه زمـانی واکـنش PCR تنظیم گردید.

جدول۲- برنامه زمانی واکنش PCR

مراحل انجام شده و دما	زمان (ثانیه)	تعداد سیکل
Initial Denaturation ۹۵°c	۱۲۰	۱
Denaturation ۹٤°c	۳۰	۳۰
Annealing ٥٦°c	۳۰	۳۰
Extension ۷۲°c	٦۰	۳۰
Final Extension ۷۲°c	٤۲۰	۱

پس از الکتروفـوزر محصـول PCR و مشـاهده بانـدهای حاصـل از واکنش PCR، در قـدم بعـدی واکـنش هضـم آنزیمـی محصـولات PCR با اسـتفاده از روش (Restriction Fragment Length Polymorphism) PCR-RFLP جهت تعیین گونه‌های کاندیدا انجام گردیـد. پـس از الکتروفـورز محصـولات PCR و اطمینـان از مثبت بودن آن، از آنزیم MSP1 (Thermo Scientific) جهـت افتـراق گونـه‌هـای کاندیـدا آلبیکـنس، کاندیـدا گلابراتـا، کاندیـدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا تروپیکالس و کاندیدا کروزیی اسـتفاده شـد. مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR بـا ۲ میکرولیتـر بـافر آنـزیم ۱۰X و ۱ میکرولیتـر آنـزیم MSP1 و ۷ میکرولیتـر آب مقطـر اسـتریل مخلـوط و بـه مـدت ۲ تـا ۳ سـاعت در دمـای ۳۷ درجـه سانتی‌گراد نگهداری شد و سپس در ژل آگارز ۱ درصـد الکتروفـورز انجام شد (آنزیم MSP1 موجب بـرش در قطعـات تکثیـر شـده در ناحیه‌ی CCGG می‌گـردد). ایزولـه هـای قـارچی بـروی محـیط سابورودکستروز آگار حاوی کلرامفیکل کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷C° قرار گرفتنـد سـپس از هـر کـدام از ایـن سویه‌های قارچی ۳-۲ کلنی به سرم فیزیولوژی استریل اضافه کـرده و کدورت آنها معادل ۰/۵ مک فارلند تنظیم شد و با شمارش سلولی توسط لام نئوبار حدود$۱۰^{۳}$×۲/۵-$۱۰^{۳}$×۰/۵ از هر کـدام از ایزولـه‌هـا سوسپانسیون قارچی تهیه شد. برای انجام تست حساسیت دارویی از روش براث میکرودایلوشـن، توصـیه شـده بـرای مخمـر M27-A3 توسط مؤسسه استاندارد های آزمایشگاه بالینی (CLSI) اسـتفاده شد (۱۹). برای انجام تست حساسیت دارویی از میکروپلیـت هـای ۹۶ خانه ای استفاده شد.

ابتدا درون چاهک ها ۱۰۰ میکرولیتر محیط RPMI1640 (ساخت شرکت سیگما) ریخته شد و غلظـت هـای متـوالی از اسـانس هـای آویشـن، میخـک، فلوکونـازول و نیسـتاتین تهیـه و در نهایـت ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلول مخمری تهیه شده از هـر کـدام از سویه های کاندیدا آلبیکنس اضافه گردید. پلیت هـای ۹۶ خانـه ای در انکوباتور شیکردار ۳۵ درجـه سـانتیگراد بـا سـرعت ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۴۸ سـاعت انکوبـه شـدند. سـپس نتـایج بـر اسـاس کدورت ایجاد شده در چاهک ها بررسی شـد. اولـین چاهـک بـدون کدورت به عنوان MIC در نظر گرفته شد. سپس ۱۰ میکرولیتـر از محتویـات چاهـک هـای MIC و چاهـک هـای بعـد از MIC کـه کدورت نداشتند، بر روی پلیت های حاوی محـیط SC بـه صـورت استریک کشت و در دمـای ۳۵ درجـه سـانتیگراد بـه مـدت۲۴-۴۸ ساعت انکوبه شدند. سپس بر اساس شمارش تعداد کلنی های رشد کرده از هر یک از رقت های دارویـی، مقـادیر حـداقل غلظـت مهـار کننـدگی از رشـد ۹۰ درصـد (MIC90) و حـداقل غلظـت کشندگی (MFC) و حداقل غلظت ممانعـت کننـدگی از رشـد ۵۰ درصد (MIC50) قارچ بدست آمد. غلظت های متوالی از اسـانس های آویشن و میخک و داروهای فلوکونازول و نیسـتاتین در حـلال دی متیـل سولفوکسـاید ٪۰/۰۵ (Dimethyl sulfoxide) تهیـه شد. هر کدام از آزمایشات سه بار تکـرار شـد و میـانگین آن هـا بـه روش تحلیل واریانس یک طرفه با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

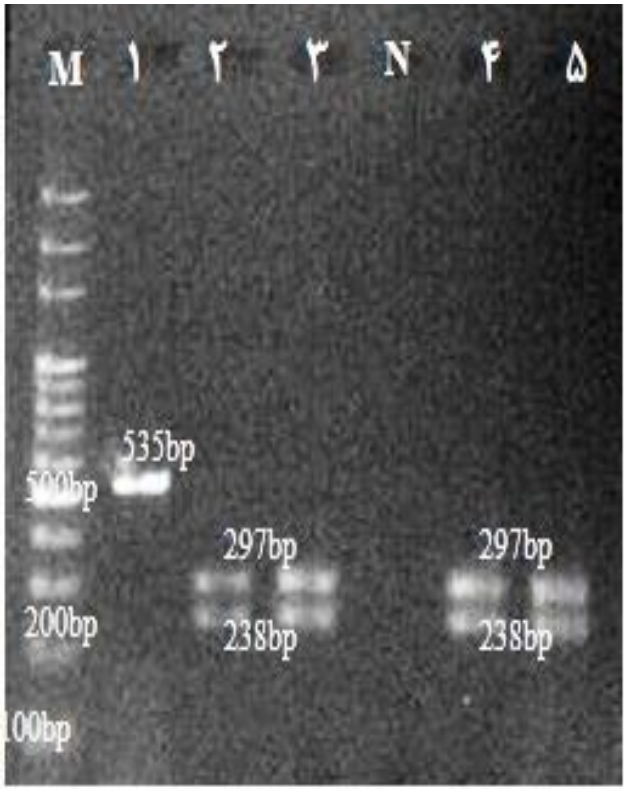
یافته ها

جهت‌بررسی‌ترکیبات اسانس‌های آویشن و میخک در این‌پژوهش از تکنیک GC-MS استفاده شد. مهمترین اجزای تشکیل دهنده اسانس های آویشن و میخک به ترتیب تیمول و اوگنول بودند(جدول ۳).

جدول ۳- نتایج آزمون اسانس های آویشن و میخک

ردیف	نام آزمون	اسانس آویشن	اسانس میخک
۱	چرخش نوری	-۲/۲	-۴/۲۰
۲	دانسیته	۰/۹۴۵	۱/۰۴۶
۳	ضریب شکست	۱/۵۰۰۶	۱/۵۲۸۲
۴	شفافیت	شفاف	شفاف
۵	مواد مؤثره	تیمول ۲۲/۹۶٪ کارواکرول ۳۹/۸٪	بتا-کاریوفیلین ۱۲/۲۴٪ اوگنول ۷۳/۳۵٪ استیل-اوگنول ۸/۹۹٪

نتایج حاصل از PCR-RFLP نشان داد که اندازه قطعات پس از هضم آنزیمی توسط آنزیم Msp1 در سویه های کاندیدا ۲۰۰bp تا ۶۰۰bp می باشد. مطابق تصویر ۱ عملکرد آنزیم Msp1 بر روی محصولات PCR در تمامی نمونه های مربوط به کاندیدا آلبیکنس منجر به تولید دو باند مشخص به طول bp ۲۳۸ و bp ۲۹۷ گردید .



تصویر ۱- ژل آگارز محصول PCR-RFLP: M: مارکر DNA 100bp، شماره ۱: محصول PCR نمونه های بالینی به طول 535bp، شماره های ۲، ۳و ۴ محصول آنزیم MSP1 به طول 238bp و 297bp و N: کنترل منفی و شماره ۵ کنترل مثبت *کاندیدا آلبیکنس* ATCC10231.

یافته های حاصل از تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد با روش بـراث میکرودایلوشـن بـرای نیسـتاتین در محـدوده IU/ml ۹/۲-۵/۳۷ بر علیه ایزوله های بالینی کاندیدا آلبیکنس بدست آمد.

همچنین محدوده MIC داروی فلوکونازول علیه ایزوله های بـالینی کاندیدا آلبیکنس در غلظت ۱۲/۵-۳/۱۲میکروگـرم بـر میلـی لیتـر تعیین شد(جدول ۴).

جدول ۴- نتایج حاصل از تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی رشد

	ایزوله‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس (µL/ml)		
دارو	MIC50	MIC90	MFC
اسانس آویشن	۰/۰۰۳	۰/۰۰۶	۰/۰۱۲
اسانس میخک	۰/۴۷	۰/۹۵	۱/۹۱

بحث

با توجه به محدودیت استفاده از داروهای ضد قارچی مناسب و مؤثر و افزایش عفونت های کاندیدیایی بویژه کاندیدا آلبیکنس و از طرفی افزایش مقاومت های دارویی، ضرورت کشف عوامل جدید و بهتر برای درمان عفونت های قارچی لازم است. این مطالعه با هدف بررسی اثر ضد قارچی اسانس های آویشن و میخک در مقایسه با داروهای فلوکونازول و نیستاتین بر علیه ایزوله های بالینی کاندیدا آلبیکنس در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.در این مطالعه علاوه بر آزمون های مورفولوژیک و روش های فنوتیپی (آزمون لوله زایا در سرم تازه انسان، کشت در محیط کروم آگار، کشت در محیط کورن میل آگار حاوی توئین۸۰)، از روش مولکولی PCR-RFLP برای تعیین دقیق هویت عوامل مخمری استفاده شد چرا که این تست ها بر خلاف روش های فنوتیپی کمتر تحت تاثیر عوامل محیطی بوده و از طرفی تکرارپذیری و قابلیت اعتماد بالاتری دارند. از مارکر مولکولی برای آنالیز محصولات PCR و همچنین محصولات PCR-RFLP پس از برش آنزیمی بر روی ژل آگارز استفاده شد. نتایج مربوط به PCR-RFLP قطعه ITS1-5.8S-ITS2 با استفاده از آنزیم Msp1 (با سایت برش CCGG) در مورد *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا دابلینینسیس*، *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا تروپیکالیس* با توجه به اینکه یک محل برش در روی قطعه تکثیر شده دارند دو باند مشخص با اندازه متفاوت را نشان داد که با آنچه مورد انتظار بود و با نتایج سایر مطالعات مطابقت داشت. در همین راستا آیت اللهی موسوی و همکاران در سال ۲۰۱۲، در مطالعه ای با استفاده از روش PCR-RFLP از ۱۳۹ بیمار مبتلا به ویروس ایدز، ۹۶ گونه کاندیدا آلبیکنس را با استفاده از آنزیم MspI جدا کردند و این روش را تکنیکی مفید جهت افتراق گونه های کاندیدا توصیف کردند (۲۰). در سال ۲۰۱۵ دیگو و همکاران PCR-RFLP را روش با ارزشی برای شناسایی عوامل قارچی عفونی مهاجم معرفی نمودند (۲۱). از آنجایی که در مطالعات دیگری نیز از آنزیم Msp1 به عنوان یک افتراق دهنده در ایزوله های های کاندیدا استفاده شده بود (۲۲ و۲۳)، در این مطالعه نیز آنزیم Msp1 برای انجام PCR-RFLP استفاده شد و کاندیدا آلبیکنس بودن ایزوله های بالینی با توجه به الگوی باندهای بدست آمده از الکتروفورز محصول PCR-RFLP مورد تایید قرار گرفت و با یافته های پژوهشگران قبلی برای شناسایی کاندیدا آلبیکنس تفاوتی مشاهده نشد. دانشمندان در گذشته اثر ضد میکروبی آویشن و میخک را در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند (۲۴ و ۲۵). نتایج حاصل از مطالعه حاضر در بررسی تست های حساسیت دارویی نشان داد که اسانس های آویشن و میخک دارای اثر ممانعت کنندگی از رشد ایزوله های بالینی کاندیدا آلبیکنس می باشند. بر اساس یافته های این مطالعه (جدول ۴) اسانس آویشن در مقایسه با اسانس میخک دارای فعالیت ضدقارچی بیشتری علیه ایزوله های بالینی کاندیدا البیکنس بود و در مقایسه با داروهای نیستاتین و فلوکونازول به ترتیب اسانس آویشن و سپس اسانس میخک فعالیت ضد قارچی بیشتری از خود نشان دادند. در همین راستا در مطالعه ای که Kumar و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام دادند، بیانگر این مطلب بود که بالاترین فعالیت ضد قارچی در بین اسانس ها متعلق به اسانس آویشن است (۲۶). کارواکرول و اوگنول به ترتیب اجزای مهم تشکیل دهنده اسانس های آویشن و میخک را تشکیل می دهند و مطابق با گزارش گروهی دیگر از محققان، اسانس گیاه دارویی آویشن از خاصت قارچ کشی بیشتری برخوردار است (۲۷).

حقیقی و همکاران در سال ۲۰۱۱ فعالیت ضد قارچی اسانس های آویشن باغی، جعفری، زیره سبز و زیره سیاه روی کاندیدا آلبیکنس در مقایسه با فلوکونازول مورد مطالعه قرار دادند آنها حداقل غلظت مهار کنندگی اسانس های آویشن باغی، جعفری، زیره سبز و زیره سیاه به ترتیب ۲۵، ۷۲، ۴۱۲ و ۱۳۰ میکروگرم در میلی لیتر و حداقل غلظت کشندگی ۴۸، ۱۴۶، ۶۲۰ و ۲۸۰ میکروگرم در میلی لیتر گزارش نمودند (۲۸). در مطالعه دیگری پذیرا و همکاران در سال ۲۰۱۷ فعالیت ضد قارچی اسانس آویشن باغی را در شرایط آزمایشگاهی بر روی قارچ های جداشده از پوست ماهی مورد مطالعه قراردادند. آنها حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد اسانس آویشن باغی را برای آسپرژیلوس نیجر، آسپرژیلوس فومگاتوس و آسپرژیلوس فلاوس ۲۵ میکرولیتر بر میلی لیتر گزارش نمودند، لیکن MIC گونه ساپرولگنیا پارازیتیکا متفاوت بود و در غلظت ۵۰ میکرولیتر بر میلی لیتر به دست آمد. (۲۵). در مطالعه حاضر MIC اسانس های آویشن و میخک به ترتیب ۰/۰۰۳ و ۰/۴۷ میکرولیتر در میلی لیتر بدست آمد که با نتایج به دست آمده از پژوهشگران قبلی تضاد دارد. حساسیت بیشتر ایزوله های بالینی کاندیدا آلبیکنس می تواند به علت متفاوت بودن درصد ترکیبات و نوع

ترکیبات دیواره سلولی و غشای قارچی باشد که احتمالا در کاندیـدا آلبیکنس به مراتب کمتر از گونه های آسپرژیلوس و بـه طـور کلـی بسیار کمتر از قارچ های میسلیال می باشد (۲۹).

نتیجه گیری

یافته های حاصل از این مطالعه نشان داد که اسانس های آویشن و میخک به ترتیب دارای فعالیت ضد قارچی بیشتری در مقایسه با داروهای فلوکونازول و نیستاتین بر علیه ایزوله های بالینی واژینال کاندیدا آلبیکنس می باشند. با توجه به نتایج این تحقیق، پیشنهاد می گردد تحقیقات گسترده تری در شرایط بالین با استفاده از اسانس های آویشن و میخک انجام پذیرد تا در آینده از این اسانس ها برای کنترل و درمان بیماری ولوواژنیت ناشی از کاندیدا آلبیکنس استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل پایان نامه شماره ۱۷۹۳ مصوب ۹۶/۳/۵ می باشد که توسط دانشگاه علوم پزشکی زاهدان حمایت گردیده است.

EFERENCES

1- Antony G, Saralaya V, Gopalkrishna Bhat K, Shalini Shenoy M, Shivananda PG. Effect of phenotypic switching on expression of virulence factors by *Candida albicans* causing candidiasis in diabetic patients. Rev Iberoam Micol. 2009; 26(3): 202-5.

2- Ganguly S, Mitchell AP. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. Curr Opin Microbiol. 2011; 14(4): 380-5.

3- Perumal P, Mekala S, Chaffin WL. Role for cell density in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51(7): 2454–63.

4- Seneviratne CJ, Jin LJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Cell density and cell aging as factors modulating antifungal resistance of *Candida albicans* biofilms. Antimicrob agents chemother. 2008; 52(9): 3259-66.

5- Nasiri KashaniMJ,Falahati M,Motevalian M, Yazanparast S.A, FatehR.A.In vitro anti fungul activity of shallot extract and its comparision with miconazole.Qom. University of Medical Sciences. 2009; 3(3): 13-18.

6- Kashani H, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi SA, Shahidi, F. Antifungal effects of Pinus elderica extracts on *Aspergillus niger* and *Candida albicans*. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical. 2014; 20 (69).

7- Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr Med Chem 2003; 10(10): 813-29.

8- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils: a review. Food Chem Toxicol 2008;46(2):446-75.

9- Prabodh S, Brittney LM, Robert L McF and William NS. Essential Oil Characterization of *Thymus vulgaris* from Various Geographical Locations. *Foods* 2016, *5*(4), 70; https://doi.org/10.3390/foods5040070.

10- Momeni TKH, Shahrokhi N. Herbal Essences and Their Therapeutic Effects. Tehran University Press. 4th ed. 2015. (Text in Persian).

11- Ghasemi Dehkordi N (Ed.). Iranian Herbal Pharmacopoeia. Ministry of Health Publisher. Tehran. 2002, pp: 795.

12- Aali E. Mahmoudi R. Kazeminia M. Hazrati R. Azarpey F. Essential oils as natural medicinal substances: review article. Tehran Univ Med J (TUMJ) 2017 October;75(7):480-9.

13- Zakipour Rahimabadi E DM. The Effects of Coating and Zataria multiflora Boiss Essential Oil on Chemical Attributes of Silver Carp Fillet Stored at 4ºC. International Food Research Journal. 2012; 19(2): 685-90.

14- Gómez-Estaca J, López de Lacey A, López-Caballero M, Gómez-Guillén M, Montero P.

Biodegradable gelatin–chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. Food Microbiology. 2010; 27(7): 889-96.
15- Hao Y, Brackett R, Doyle M. Efficacy of plant extracts in inhibiting Aeromonas hydrophila and Listeria monocytogenes in refrigerated, cooked poultry. Food Microbiology. 1998; 15(4): 367-78.
16- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International journal of food microbiology. 2004; 94(3): 233-53.
17- Manabe A, Nakayama S, Sakamoto K. Effects of essential oils on erythrocytes and hepatocytes from rats and dipalmitoyl phosphatidylcholine-liposomes. Japanese journal of pharmacology. 1987; 44(1): 77-84.
18- Cox S, Mann C, Markham J, Bell H ,Gustafson J, Warmington J, et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil). Journal of applied microbiology. 2000; 88(1): 170-5.
19- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: 3th ed. CLSI document M27-A3. Pennsylvania:Wayne, PA2008.
20- Ayatolahi Mousavi SA, Salari S, Rezaie S, Shahabi Njad N, Hadizadeh S, Kamyabi H. Identification of candida species isolated from oral colonization in Iranian HIV-positive patient by PCR-RFLP Method. Jundishapur J Microbiol 2012;5(1):336-40.
21- Diego RT, de Sousa A, Carla S, Silva Santos B, BodoWanke C, Roberto Moreira d a Silva Júniora, et al. PCR-RFLP as a useful tool for diagnosis of invasive mycoses in a healthcare facility in the North of Brazil. Electronic Journal of Biotechnology. 2015;18:231-5.
22- Farasat A, Ghahri M, Mirhendi H, Beiraghi S. Identification of candida species screened from catheter using patients with PCR-RFLP method. Eur J Exerimen Biol 2012;2(3):651-6.
23- Solimani P, Salari S, khalizadeh S, Hassanzad M, Khodavaisy S, Abastabar M, et al. Use of PCR-RFLP and PCR-HWP1 for Identification of Candia Species Isolated from Cystic Fibrosis Patients. Res Mol Med (RMM). 2014;2(3):24-8.
24- Ahmad N, Alam MK, Shehbaz A, Khan A, Mannan A, Hakim SR, et al. Antimicrobial activity of clove oil and its potential in the treatment of vaginal candidiasis. Journal of drug targeting. 2005 Dec;13(10):555-61. PubMed PMID: 16390816.
25- Mathew BP, Nath M. Recent approaches to antifungal therapy for invasive mycoses. ChemMedChem. 2009 Mar;4(3):310-23. PubMed PMID: 19170067 .
26- Kumar Singh A, Seniya C, Prasad S. Isolation of Aspergillus flavus from stored food commodities and Thymus vulgaris (L.) essential oil used as a safe plant based preservative. 2009. 343-9.
27- Böhme K, Barros-Velázquez J, Calo-Mata P, Aubourg SP. Antibacterial, Antiviral and Antifungal Activity of Essential Oils: Mechanisms and Applications. In: Villa TG, Veiga-Crespo P, editors. Antimicrobial Compounds: Current Strategies and New Alternatives. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 51-81.
28- Haghighi F, Roudbar Mohammadi S, Soleimani N, Sattari M. Evaluation of antifungal activity of essential oils of Thymus vulgaris, Petroselinum Crispum, Cuminum cyminum and Bunium persicum on candida albicans in comparison with Fluconazole. MJMS. 2011; 14 (1) :29-35. URL: http://journals.modares.ac.ir/article-30-4763-fa.html.
29- Roudbary M, Roudbarmohammadi Sh, Hajimoradi M, Taghizadeharmaki M, Ghasemisakha F, Vahidi M. Evaluation of antifungal activity of alcoholic extract and safranol of Crocus sativum on *Candia albicans* and *Candida dublininsis*"growth in vitro".JUMJ2009.