View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by eprints Iran University of Medical Sciences

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 12:21 IRDT on Tuesday September 17th 2019

مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، بهمن ۱۳۹۶، دوره ۷۵، شماره ۱۱، صفحه‌های ۸۳۹ تا ۸۴۷ TUMJ

مقاله اصیل

بررسی اثر هم‌افزایی ۲-فنیل اتانول و کلوتریمازول بر روی گونه‌های کاندیدایی جدا شده از بیماران ولوواژینیت کاندیدایی مزمن

نیلوفر مجدآبادی[۱]، مهربان فلاحتی[۲*]
فریبا حیدری کهن[۳]، شیرین فره‌یار[۲]
پروانه رحیمی مقدم[٤]، مهتاب اشرفی خوزانی[۲]

۱- گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، پردیس بین‌الملل، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
۲- گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
۳- کلینیک زنان و زایمان، بیمارستان لولاگر، تهران، ایران.
٤- گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

[*] نویسنده مسئول: تهران، بزرگراه شهید همت، دانشگاه علوم پزشکی ایران.
کدپستی: ١٤٤٩٦١٤٥٣٥ تلفن: ۰۲۱-۸۸٦۲۲٦٥۳
E-mail: mehrabanfalahati@yahoo.com

چکیده

دریافت: ۱۳۹٦/۰٥/۱۸ ویرایش: ۱۳۹٦/۰٥/۲٥ پذیرش: ۱۳۹٦/۱۱/۰۱ آنلاین: ۱۳۹٦/۱۱/۱۰

زمینه و هدف: ماده‌ای بدون رنگ و معطر به‌نام ۲-فنیل اتانول با اثر ضد میکروبی به‌طور گسترده در وسایل آرایشی، عطرها و صنایع غذایی به‌کار برده می‌شود. ولوواژینیت کاندیدایی مزمن، التهاب ولوواژینال ایجادشده توسط گونه‌های کاندیدا است. مقاومت نسبت به کلوتریمازول که از داروهای متداول در درمان این بیماری است در بسیاری از بیماران گزارش شده است. بنابراین در جهت بهبود درمان، اثر همبست کلوتریمازول با ۲-فنیل اتانول بر روی گونه‌های کاندیدا جدا شده از ولوواژینیت مزمن کاندیدایی بررسی گردید.

روش بررسی: این مطالعه‌ی مداخله‌ای، از اسفند ۱۳۹٤ تا آذر ۱۳۹٥ بر روی گونه‌های کاندیدایی جداشده از زنان مبتلا به ولوواژینیت مزمن مراجعه‌کننده به بیمارستان لولاگر تهران در دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام شد. نمونه‌ها مورد آزمایش مستقیم، کشت بر روی محیط کاندیدا کروم آگار (جهت شناسایی اولیه ایزوله‌ها)، سابورو دکستروز آگار (جهت حفظ ایزوله‌ها) و تعیین توالی ناحیه ITS (جهت شناسایی قطعی گونه‌های کاندیدا) قرار گرفتند. سپس کلوتریمازول و ۲-فنیل اتانول به‌تنهایی و در همبست بر روی گونه‌های جدا شده، به‌روش میکرو براث دایلوشن آزمایش شدند.

یافته‌ها: از ٤۰ سویه کاندیدایی شناسایی‌شده در این مطالعه، ۹٥٪ *کاندیدا آلبیکنس* و ٥٪ *کاندیدا آفریکانا* بودند. در آزمون همبست، میانگین MIC (حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد قارچ) ۲-فنیل اتانول و کلوتریمازول به‌تنهایی به‌ترتیب ۳۲۰۰±۰ µg/ml و ٥٦±٤۰/۱٦ µg/ml بود و بین مقادیر MIC کلوتریمازول به‌تنهایی و در همبست، تفاوت معناداری وجود داشت (P=۰/۰۲۱).

نتیجه‌گیری: در همبست کلوتریمازول و ۲-فنیل اتانول اثر هم‌افزایی مشاهده شد.

کلمات کلیدی: ۲-فنیل اتانول، عوامل ضد قارچی، گونه‌های کاندیدا، کلوتریمازول، مقاومت دارویی.

مقدمه

۲-فنیل اتانول یا فنیل اتیل الکل ماده‌ای بدون رنگ و معطر با بوی شبیه به گل سرخ است و به‌همین دلیل در وسایل آرایشی و عطرها و صنایع غذایی به‌طور گسترده‌ای به‌کار برده می‌شود.[۱] این ماده به‌طور گسترده در طبیعت در گیاهان معطری مانند گل سرخ، زنبق، سنبل و بهارنارنج وجود دارد[۲] و در برابر باکتری‌های *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Enterococcus faecium* قارچ‌های *Candida albicans*، *Candida dubliniensis*، *Saccharomyces cerevisiae*، *Kluyveromyces marxianus*، *Aspergillus niger*، *Rhizopus nigricans* و *Neurospora crassa* اثر ضد میکروبی دارد.[۵-۲]

فنیل اتیل الکل توسط گونه‌های *Candida dubliniensis*، *Candida parapsilosis* و *Candida tropicalis* نیز تولید می‌شود، زمانی که غلظت خارج سلولی فنیل اتیل الکل به‌میزان معینی برسد، از رشد

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 12:21 IRDT on Tuesday September 17th 2019

رشته‌ای و تشکیل جرم تیوب در *کاندیدا آلبیکنس* جلوگیری می‌کند.[۳و٤و٦و۷] این الکل از تغییر حالت مورفولوژیکی از فرم مخمری به فرم رشته‌ای بیش از ۵۰٪ جلوگیری می‌کند،[٤و۸و۹] و نقش انگیزان (سیگنالینگ) مورفوژنتیک را در *کاندیدا آلبیکنس* بازی می‌کنند، همچنین به‌عنوان مولکول انگیزان در بعضی از باکتری‌ها به‌کار می‌رود.[٦و۹] این که چطور اتیل الکل از مورفوژنز فرم مخمر به هایف جلوگیری می‌کند نامشخص باقی مانده است. ممکن است غشا را ناپایدار کند که ناحیه‌ای از پروتیین‌های درگیر در انتقال سیگنال در غشا هستند و تداخل در انتقال سیگنال‌ها برای مورفوژنز فرم مخمری به هایفی ضروری است.[٦]

ایمیدازول‌ها مانند کلوتریمازول اولین آزول‌های توسعه‌یافته هستند. اما به‌دلیل سمیت بالای آن‌ها، عوارض جانبی شدید و فعل و انفعالات متعدد آن‌ها با دیگر داروها، تری‌آزول‌ها جایگزین آن‌ها شده‌اند. افزایش مقاومت به آزول‌ها به‌طور اساسی به‌دلیل ماهیت ممانعت‌کنندگی از رشد قارچ به‌جای کشندگی قارچ است و با تعداد سلول‌های $CD4^+$، بار قارچی، طول مدت و دوز درمان در ارتباط است. از طرفی قارچ‌ها ارگانیسم‌های یوکاریوتی هستند که انگل میزبان‌های یوکاریوتیک خود هستند، بنابراین تفاوت فیزیولوژیک ناچیز بین آن‌ها توسعه طیف وسیعی از عوامل ضد قارچ ایمن را مشکل می‌سازد.[۱۰و۱۱]

ولوواژینیت کاندیدایی مزمن یک نوع التهاب ولوواژینال است که توسط گونه‌های کاندیدا ایجاد می‌شود و درمان آن مشکل است.[۱۲] بیشتر بیماران از قرمزی واژینال، دردناکی، سوزش، مقاربت دردناک و سوزش ادرار شکایت دارند. در مقایسه با واژینیت باکتریال ترشح واژینیت کاندیدایی بوی ناخوشایند ندارد.[۱۳] درمان عفونت به شرایط بیمار (وضعیت سیستم ایمنی) بستگی دارد. درمان‌های نگهدارنده‌ی موضعی و خوراکی برای جلوگیری از عود بیماری توصیه شده است. کلوتریمازول موضعی ۵۰۰ mg، کتوکونازول خوراکی ۱۰۰ mg یا فلوکونازول خوراکی ۱۵۰ mg برای درمان موارد عودکننده به‌کار برده می‌شوند.

بااین‌حال عود بیماری در حدود نیمی از موارد در مدت کوتاهی پس از اتمام دوره‌ی درمانی رخ می‌دهد.[۱۳و۱٤] در این مطالعه اثر ۲-فنیل اتانول به‌تنهایی و در همبست با داروی کلوتریمازول بر روی نمونه‌هایی کاندیدایی جدا شده از ولوواژینیت مزمن بررسی گردید.

روش بررسی

این مطالعه به‌صورت مداخله‌ای از ابتدای اسفند ۱۳۹٤ تا پایان آذر ۱۳۹۵ بر روی گونه‌های کاندیدایی جدا شده از زنان مبتلا به ولوواژینیت مزمن مراجعه‌کننده به بیمارستان لولاگر تهران انجام شد. روش نمونه‌گیری آسان و در دسترس برای محاسبه حجم نمونه، به‌مدت شش ماه (از ابتدای اسفند ۱۳۹٤ تا پایان مرداد ۱۳۹۵) انتخاب و تعداد ۲۰۰ بیمار براساس میزان شیوع ولوواژینیت کاندیدایی عودکننده در ایران محاسبه شد،[۱۵و۱٦] که از بین این تعداد، بیماران مبتلا به ولوواژینیت کاندیدایی مزمن و عودکننده‌ای که نتیجه کشت نمونه‌ی آن‌ها بر روی محیط کاندیدا کروم آگار (CHROMagar™, France) پس از ۷۲ ساعت مثبت شد، انتخاب شدند.

جهت نمونه‌گیری از بیماران، نمونه ترشحات واژن تحت نظر پزشک متخصص زنان و زایمان با رعایت مفاد کنوانسیون هلسینکی و رضایت و آگاهی بیماران، با سوآب پنبه‌ای سترون از زنان دارای علایم مراجعه‌کننده به کلینیک زنان بیمارستان لولاگر گرفته شد. سپس سوآب‌ها در لوله‌های فالکون سترون حاوی محیط نگهدارنده (۲ ml فسفات بافر سالین) (Medicago, Canada) گذاشته شدند. فرم پرسشنامه و داده‌های مربوط به هر بیمار تکمیل و به نمونه واژن مربوطه پیوست شد. سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران منتقل شدند.

شناسایی نمونه‌ها با استفاده از لام مستقیم، کشت و تعیین توالی ناحیه ITS به‌ترتیب انجام شد. به‌منظور تهیه لام مستقیم از نمونه واژن موجود در لوله فالکون، ۲-۱ قطره بر روی لام ریخته و به آن یک قطره پتاسیم هیدروکسید ۲۰-۱۰٪ اضافه نموده و با آنس سترون آن را مخلوط کرده و یک لامل بر روی آن گذاشته شد. لام تهیه‌شده با میکروسکوپ نوری بررسی شد، وجود سلول‌های مخمری گرد یا بیضی شکل به‌همراه هایف حقیقی یا کاذب نشان‌دهنده وجود گونه‌های کاندیدا بود.

سپس نمونه‌ها جهت شناسایی اولیه بر روی محیط کروم آگار کشت داده شدند و به‌مدت دو روز در ۳۷ °C انکوبه شدند. پس از اتمام انکوباسیون رنگ ایجادشده در پلیت‌های کروم آگار مربوط به هر نمونه ثبت و نمونه‌ها جهت خالص‌سازی و نگهداری بر روی محیط سابورو دکستروز آگار شیب‌دار (1054380500- Merck, Germany)

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 12:21 IRDT on Tuesday September 17th 2019

برده شدند.

تشخیص نهایی گونه‌های کاندیدا با استفاده از روش مولکولی Polymerase chain reaction (PCR) توسط پرایمرهای یونیورسال ITS1 و ITS4 (TAG- Copenhagen, Denmark) و تعیین توالی انجام شد، به‌طور خلاصه نمونه‌های کاندیدایی بر روی محیط YEPD جامد (Yeast extract; Y1625 Sigma, (Yeast extract peptone glucose agar) glucose; G8270 Sigma, peptone; Merck-146447, agar; 101614–Merck, chloramphenicol; C0378 Sigma, Germany) کشت داده و به‌مدت ۴۸–۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ °C قرار داده شدند، براساس پروتکل استخراج سریع Deoxyribonucleic acid (DNA) از کلنی کاندیدا، DNA استخراج شد،[17] پرایمرها خریداری و براساس دستورکار سازنده با میزان مناسبی از آب مقطر سترون مخلوط شدند، سپس به‌ازای هر نمونه به این ترتیب عمل شد: Master Mix (Ampliqon- ITS4+۱λ۵/۹+۱λ آب مقطر+ ۱λ ITS1+۱λ۵/۱۲ 180301, Denmark) DNA الگو.

در لوله کنترل منفی به‌جای DNA الگو، ۱λ آب مقطر سترون افزودیم. با استفاده از ترموسایکلر (Peqlab, Germany) سیکل‌های حرارتی PCR انجام شدند، سپس الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز (A9539 Sigma, Germany) انجام و تصاویر ثبت‌شده از ژل‌های الکتروفورز را به‌همراه محصولات PCR جهت تعیین توالی و شناسایی گونه‌های کاندیدا به شرکت (Bioneer, Daejeon, Korea) ارسال گردید.

آزمون حساسیت دارویی به‌تنهایی به‌روش میکروبراث دایلوشن برابر پروتکل Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3[18] بر روی ۴۰ گونه کاندیدایی جدا شده از ولوواژینیت کاندیدایی مزمن و عودکننده برابر مراحل زیر انجام شد.

برای تهیه محلول استوک کلوتریمازول (C6019 Sigma, Germany) با غلظت ۱۲۸ µg/ml براساس پروتکل CLSI M27-A3[18] مقدار مناسب از پودر کلوتریمازول را با ترازوی حساس آزمایشگاهی (HR-200, Mettler Toledo Company Columbus, Ohio, USA) وزن و این مقدار را در حجم مناسبی از دی‌متیل‌سولفوکساید (102952-Merck, Germany) تا زمانی که پودر دارو به‌طور کامل حل شد، مخلوط کردیم. مخلوط حاصل را با فیلتر میلی‌پور با قطر منفذ ۰/۲۲ µm (Membrane Solutions, China) فیلتر کردیم. رقت‌های پایین‌تر دارو در ابتدای هر روز کاری از غلظت ۱۲۸ تا ۰/۰۳۱۲۵ µg/ml به‌صورت سریالی براساس پروتکل CLSI M27-S3 تهیه شدند. برای تهیه محلول استوک ۶۴۰۰ µg/ml، از ۲-فنیل اتانول مایع (P13622 Aldrich, Germany) با توجه به مایع بودن این ترکیب و با توجه به حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد (MIC) مشاهده شده از این ترکیب در پژوهش‌های پیشین،[19و20] مقدار مناسبی از ۲-فنیل اتانول با دی‌متیل‌سولفوکساید رقیق شد.[21] سپس استوک اولیه را با فیلتر میلی‌پور با قطر منفذ ۰/۲۲ µm فیلتر کردیم. رقت‌های پایین‌تر دارو در ابتدای هر روز کاری از غلظت ۶۴۰۰ تا ۱۰۰ µg/ml به‌صورت سریالی در دی‌متیل‌سولفوکساید تهیه شدند. پس از تهیه استوک‌های دارویی، از کشت تازه کاندیدا (۴۸–۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۵ °C) سوسپانسیون مخمری در سرم فیزیولوژی ۰/۸۵٪ تهیه و با استفاده از اسپکتروفوتومتر (Spectrophotometer, Novaspec II Visible Pharmacia LKB Biotechnology, Cambridge, England) در طول موج ۵۳۰ nm و تغییر دادن تراکم سلولی، عبور نوری ۹۰–۸۵٪ را ایجاد کردیم که حاوی ۱×۱۰۶ سلول در هر میلی‌لیتر بود. سپس این سوسپانسیون به نسبت ۱:۵۰ و ۱:۲۰ در محیط RPMI 1640 مایع با گلوتامین، بدون بی‌کربنات و با فنول رد که به‌عنوان شاخص PH است (R6504 Sigma, Germany) (Roswell park memorial institute) رقیق شد تا سوسپانسیون به‌دست‌آمده حاوی ۱×۱۰۳–۵×۱۰۳ سلول باشد.

جهت اندازه‌گیری MIC کلوتریمازول و ۲-فنیل اتانول به‌تنهایی از پلیت‌های استریل ۹۶ خانه دردار (Becton Dickinson, USA) استفاده شد که میزان ۱۰۰ µl از دارو کلوتریمازول به‌ترتیب از غلظت ۱۲۸ µg/ml تا غلظت ۰/۰۳۱۲۵ µg/ml به‌صورت عمودی در پلیت ریخته شد و در مورد ۲-فنیل اتانول نیز میزان ۱۰۰ µl از ۲-فنیل اتانول به‌ترتیب از غلظت ۶۴۰۰ µg/ml تا غلظت ۱۰۰ µg/ml به‌صورت عمودی در پلیت ریخته شد.

۱۰۰ µl سوسپانسیون مخمری به همه چاهک‌ها اضافه شد. به ستون کنترل مثبت ۱۰۰ µl محیط RPMI 1640 و ۱۰۰ µl سوسپانسیون مخمری اضافه شد. در ستون کنترل منفی هم ۲۰۰ µl محیط RPMI 1640 ریخته شد و یک چاهک هم به‌عنوان کنترل حلال دی‌متیل‌سولفوکساید در نظر گرفته شد که حاوی ۱۰۰ µl محیط RPMI 1640 به‌همراه دی‌متیل‌سولفوکساید و ۱۰۰ µl سوسپانسیون مخمری بود. میکروپلیت‌ها را به‌مدت ۵–۳ دقیقه بر روی شیکر قرار داده و سپس آن‌ها را در انکوباتور ۳۵ °C گذاشته و پس از ۴۸ ساعت آن‌ها را مورد بررسی قرار دادیم. برای خوانش میکروپلیت‌ها به‌صورت چشمی

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 12:21 IRDT on Tuesday September 17th 2019

از آینه استفاده کردیم و برای هر نمونه حداقل غلظتی را که در آن رشدی مشاهده نشد به‌عنوان MIC کلوتریمازول و یا ۲-فنیل اتانول به‌تنهایی در نظر گرفته شد.

نمونه‌های مقاوم و حساس کلوتریمازول براساس مطالعه‌ی Pelletier و همکارانش تعیین شدند.[۲۲] برای تعیین حداقل غلظت کشندگی قارچ، محتویات خانه‌ی حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد دارو و خانه‌های پیش از آن با استفاده از لوپ سترون در پلیت سابورو گلوکز آگار جامد کشت داده شدند و پس از ٤٨ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند. اولین غلظتی که در آن رشدی مشاهده نشد به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی دارو در نظر گرفته شد.

حساسیت دارویی در همبست برای شش نمونه‌ی مقاوم به کلوتریمازول انجام شد.[۲۳] تهیه استوک‌های دارویی و سوسپانسیون مخمری همانند آزمون حساسیت دارویی به‌تنهایی صورت گرفت.

جهت اندازه‌گیری MIC کلوتریمازول و ۲-فنیل اتانول در همبست از پلیت‌های استریل ۹٦ خانه دردار استفاده شد که میزان µl ۵۰ از کلوتریمازول به‌ترتیب از غلظت µg/ml ١٦ تا غلظت µg/ml ۰/۰۳۱۲۵ به‌صورت عمودی از ستون یک تا ۱۱ در پلیت ریخته شد. µl ۵۰ از ۲-فنیل اتانول به‌ترتیب از غلظت µg/ml ٦٤۰۰ تا غلظت µg/ml ۱۰۰ به‌صورت افقی به‌ترتیب از ردیف A تا G ریخته شد. به ردیف H و ستون ۱۱، µl ۵۰ محیط RPMI 1640 اضافه شد تا ردیف H کلوتریمازول به‌تنهایی و ستون ۱۱، ۲-فنیل اتانول به‌تنهایی باشد. µl ۱۰۰ سوسپانسیون مخمری به همه چاهک‌ها اضافه شد. دو خانه در ستون ۱۲ به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند که µl ۱۰۰ محیط RPMI 1640 و µl ۱۰۰ سوسپانسیون مخمری به آن‌ها اضافه شد.

دو خانه هم در ردیف ۱۲ به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند که µl ۲۰۰ محیط RPMI 1640 در آن‌ها ریخته شد و یک چاهک هم به‌عنوان کنترل حلال دی‌متیل‌سولفوکساید در نظر گرفته شد که حاوی µl ۱۰۰ محیط RPMI 1640 به‌همراه دی‌متیل‌سولفوکساید و µl ۱۰۰ سوسپانسیون مخمری بود. به‌این‌ترتیب بیشترین غلظت دارو در اولین چاهک عمودی و افقی بود و کمترین غلظت دارو در هفتمین چاهک افقی و دهمین چاهک عمودی بود. سپس میکروپلیت‌ها را به‌مدت ۵-۳ دقیقه بر روی شیکر قرار داده و آن‌ها را در انکوباتور °C ۳۵ گذاشته و پس از ۷۲-٤٨ ساعت آن‌ها را مورد بررسی قرار دادیم. برای خوانش میکروپلیت‌ها به‌صورت چشمی از آینه استفاده کردیم.

در ستون ۱۱ و ردیف H که داروها به‌تنهایی ریخته شده بودند اولین خانه‌ای که در آن رشد دیده نشد به‌عنوان MIC به‌تنهایی در نظر گرفته شد و براساس پروتکل Antifungal combination خانه MIC در همبست نیز تعیین و با استفاده از معادله شاخص غلظت ممانعت‌کنندگی سهمی (FICI)، سینرژیسم (اثر هم‌افزایی)، آنتاگونیسم (اثر کاهندگی) و یا بی‌اثر بودن داروها در همبست تعیین و تفسیر نتایج FICI به‌این‌صورت انجام شد: ۰/۵≥ سینرژیسم، ۰/۵< و ٤> بی‌اثر، ٤≥ آنتاگونیسم.[۲۳]

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از SPSS software, version 16 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) و Mann-Whitney U test و Paired samples t-test انجام شد. ضریب اطمینان آزمون‌های یاد شده و میانگین‌ها ۹۵٪ و تفاوت‌ها برای P<۰/۰۵، از لحاظ آماری معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

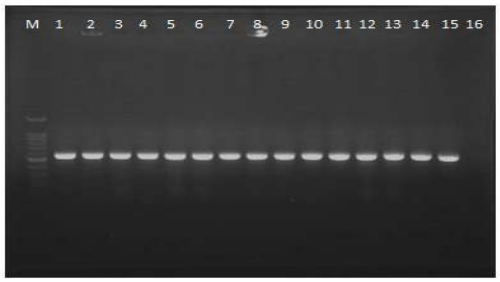
گستره‌ی سنی بیماران مبتلا به ولوواژینیت کاندیدایی مزمن و عودکننده، بین ۵۷-۱۹ سال و میانگین سن آن‌ها ۱۰/۲۵±۳٦/۱۷ سال بود. همچنین، بیشتر بیماران (۲۵٪) در گروه سنی ۳۵-۳۱ سال قرار داشتند. بیشتر بیماران تحصیلات دیپلم و فوق‌دیپلم (٤۲/۵٪) و وضعیت اقتصادی متوسط (۵۲/۵٪) داشتند، همچنین بیشتر بیماران خانه‌دار (۸۷/۵٪) بودند، دخانیات استعمال نمی‌کردند (۹۵٪) و تمام بیماران در شهر زندگی می‌کردند. در بررسی فاکتورهای مستعدکننده ابتلا به ولوواژینیت کاندیدایی مزمن و عودکننده در بین تمامی گروه‌های سنی، بیشتر بیماران (۸۲/۵٪) تحت مراقبت‌های پزشکی برای درمان ولوواژینیت کاندیدایی مزمن و عودکننده نبوده‌اند، همچنین بیشتر بیماران (۸۰٪) مبتلا به ولوواژینیت مزمن و عودکننده کاندیدایی تا زمان مراجعه به پزشک هیچ‌گونه داروی ضد قارچی مصرف نکرده بودند و یا پس از یک دوره‌ی درمانی، مصرف داروی ضد قارچ خود را قطع کرده بودند. همچنین بیشتر بیماران در این مطالعه (۹۷/۵٪) تاریخچه ابتلا به بیماری ژنتیکی و سقط فرزند نداشتند (۷۵٪)، یک و یا دو فرزند (٦۷/۵٪) و سابقه‌ی دو بار زایمان (۳۲/۵٪) داشتند. پس از انجام آزمون‌های شناسایی (کشت و PCR) بر روی نمونه‌ها، نوع گونه‌های کاندیدایی مشخص شد، از ٤۰

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 12:21 IRDT on Tuesday September 17th 2019

نمونه‌ی ولوواژینیت مزمن ۹۵٪ نمونه‌ها *کاندیدا آلبیکنس* (۳۸ مورد) و ۵٪ آن‌ها *کاندیدا آفریکانا* (دو مورد) بودند (شکل ۱).

محدوده و میانگین MIC و MFC کلوتریمازول و ۲-فنیل اتانول به‌تنهایی در جدول ۱ خلاصه شده است. MIC50 و MIC90 کلوتریمازول نیز به‌ترتیب ۱۶ و ۶۴ µg/ml و MIC50 و MIC90 ۲-فنیل اتانول ۳۲۰۰ µg/ml بود (جدول ۱).

با بررسی حساسیت و مقاومت نمونه‌ها نیز مشخص شد بیشتر نمونه‌ها مقاوم به کلوتریمازول (۸۲/۵٪) بودند (جدول ۲). میانگین FICI کلوتریمازول و ۲-فنیل اتانول در همبست ۰/۲۸±۰/۰۸ و میانگین MIC کلوتریمازول به‌تنهایی µg/ml ۵۶±۴۰/۱۶ و در همبست با ۲-فنیل اتانول µg/ml ۲±۱/۰۹ بود (جدول ۳)، همچنین بر پایه‌ی Paired samples t-test، بین مقادیر MIC کلوتریمازول به‌تنهایی و در همبست، تفاوت معناداری وجود داشت (P=۰/۰۲۱). میانگین MIC ۲-فنیل اتانول به‌تنهایی µg/ml ۳۲۰۰±۰ و در همبست با کلوتریمازول µg/ml ۷۳۳/۳۳±۱۶۳/۲۹ بود (جدول ۳)، و همچنین، بین مقادیر MIC ۲-فنیل اتانول به‌تنهایی و در همبست، تفاوت معناداری وجود داشت (P=۰/۰۰۰۱)، همچنین براساس Mann-Whitney U test، تفاوت معناداری بین میانگین MIC ۲-فنیل اتانول به‌تنهایی و میانگین MIC کلوتریمازول به‌تنهایی وجود داشت (P=۰/۰۰۰۱).



شکل ۱: *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا آفریکانا* جدا شده از بیمار در آزمون PCR

ستون M، مارکر bp ۱۰۰، ستون ۱، کنترل مثبت *کاندیدا آلبیکنس* استاندارد (PTCC5027)، ستون ۲ تا ۱۱ و ستون ۱۴ تا ۱۵، ایزوله‌های بالینی *کاندیدا آلبیکنس*، ستون ۱۲ و ۱۳، ایزوله‌های بالینی *کاندیدا آفریکانا* و ستون ۱۶، کنترل منفی

جدول ۲: نمونه‌های حساس و مقاوم کلوتریمازول

گونه	کلوتریمازول	تعداد (درصد)
	حساس ≤۰/۵	مقاوم ≥۱
کاندیدا آلبیکنس	۷(۱۷/۵)	۳۱(۷۷/۵)
کاندیدا آفریکانا	-	۲(۵)

جدول ۱: MIC و MFC کلوتریمازول و ۲-فنیل اتانول به‌تنهایی پس از ۴۸ ساعت

گونه	تعداد (٪)	MIC[۲] کلوتریمازول		MFC[۳] کلوتریمازول		MIC[۲] ۲-فنیل اتانول		MFC[۳] ۲-فنیل اتانول	
		میانگین*	محدوده*	میانگین*	محدوده*	میانگین*	محدوده*	میانگین*	محدوده*
کاندیدا آلبیکنس	۳۸(٪۹۵)	۲۵/۲۹±۵۹/۳۳	۰/۱۲۸-۵	۳۱/۳۳±۳۳/۴۴	۰/۱۲۸-۵	۲۶۳۱/۵۸	۳۲۰۰-۸۰۰	۳۲۴۲/۱۴۱۵±۱۰/۸۶	۶۴۰۰-۱۶۰۰
کاندیدا آفریکانا	۲(٪۵)	۸/۱۰±۵/۶۱	۱۶-۱	۸/۱۰±۵/۶۱	۱۶-۱	۱۶۰۰	۱۶۰۰-۱۶۰۰	۱۱۳۱±۲۴۰۰/۳۷	۳۲۰۰-۱۶۰۰
استاندارد *کاندیدا گلابراتا* CBS ۱۳۸	۱	-	۰/۲۵	-	۰/۲۵	-	۱۶۰۰	-	۱۶۰۰
کل[۱]	۴۰(۱۰۰)	۲۴/۲۸±۷۳/۸۷	۰/۱۲۸-۵	۳۰/۳۳±۱۸/۰۰۴	۰/۱۲۸-۵	۹۳۲±۲۵۸۰/۳۸	۳۲۰۰-۸۰۰	۱۴۰۳±۳۲۰۰/۲۹	۶۴۰۰-۱۶۰۰

* میانگین‌ها و محدوده‌های غلظت برحسب µg/ml بیان شده‌اند.

[۱]: محاسبات کل بدون در نظر گرفتن گونه‌ی استاندارد *کاندیدا گلابراتا* CBS ۱۳۸ (گونه‌ی کنترل) انجام شده است.

[۲]: حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد. [۳]: حداقل غلظت کشندگی قارچ.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 12:21 IRDT on Tuesday September 17th 2019

جدول ۳: FICI، MIC کلوتریمازول و ۲-فنیل اتانول به‌تنهایی و در همبست پس از ٤۸ ساعت (میکرو براث دایلوشن)

گونه	حساسیت یا مقاومت نمونه	MIC [۱] کلوتریمازول در همبست (µg/ml)	MIC [۱] کلوتریمازول به‌تنهایی (µg/ml)	MIC [۱] ۲-فنیل اتانول در همبست (µg/ml)	MIC [۱] ۲-فنیل اتانول به‌تنهایی (µg/ml)	FICI [۲]
کاندیدا آلبیکنس	مقاوم	۲	۱۲۸	٤۰۰	۳۲۰۰	۰/۱٤
کاندیدا آلبیکنس	مقاوم	۲	۳۲	۸۰۰	۳۲۰۰	۰/۳۱
کاندیدا آلبیکنس	مقاوم	٤	٦٤	۸۰۰	۳۲۰۰	۰/۳۱
کاندیدا آلبیکنس	مقاوم	۱	۳۲	۸۰۰	۳۲۰۰	۰/۲۸
کاندیدا آلبیکنس	مقاوم	۲	۱٦	۸۰۰	۳۲۰۰	۰/۳۷
کاندیدا آلبیکنس	مقاوم	۱	٦٤	۸۰۰	۳۲۰۰	۰/۲٦

[۱]: حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد. [۲]: شاخص غلظت ممانعت‌کنندگی سهمی.

بحث

پژوهش کنونی به‌منظور بررسی اثر ضد قارچی ۲-فنیل اتانول و اثر هم‌افزایی آن در ترکیب با کلوتریمازول بر روی گونه‌های کاندیدایی جدا شده از بیماران مبتلا به ولوواژینیت مزمن کاندیدایی صورت گرفت. براساس یافته‌های این مطالعه، محدوده‌ی MIC ۲-فنیل اتانول به‌تنهایی بر روی گونه‌های *آلبیکنس* و *آفریکانا* جدا شده از ولوواژینیت مزمن و عودکننده کاندیدایی، پس از ٤۸ ساعت ۳۲۰۰-۸۰۰ µg/ml بود (جدول ٤).

Paulus، MIC ۲-فنیل اتانول را در برابر مخمر *کاندیدا آلبیکنس* ۲۵۰۰ µg/ml گزارش کرده است[۲۰] که میانگین MICهای به‌دست‌آمده در پژوهش کنونی (۲۵۸۰ µg/ml) بر روی گونه‌های *آلبیکنس* و *آفریکانا*، پس از ٤۸ ساعت، با آنچه که Paulus گزارش کرد، هم‌خوانی داشت و نشان‌دهنده‌ی موثر بودن ۲-فنیل اتانول بر روی گونه‌ی *کاندیدا آلبیکنس* در حدود غلظت ۲۵۰۰ µg/ml است. Kosalec و همکاران، محدوده MIC ۲-فنیل اتانول در برابر قارچ‌های رشته‌ای آلرژی‌زای انسانی را ٦۵۰ µg/ml تا ۷٦۷۰ µg/ml گزارش کردند[۲٤] و در مطالعه‌ی دیگری بیان داشتند که مخمرها (*کاندیدا آلبیکنس*) و درماتوفیت‌های جدا شده از حیوانات (Microsporum gypseum و Trichophyton mentagrophytes) با مقادیر MIC مساوی یا کمتر از ۵٦۲۵ µg/ml حساس به ۲-فنیل اتانول هستند.[۲۵] Han و همکاران گزارش کردند که غلظت ٤-۳ g/l (۴۰۰۰-٤۰۰۰ µg/ml) ۲-فنیل اتانول به‌طور کامل از رشد مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* جلوگیری می‌کند.[۱٤] MICهای به‌دست‌آمده از مطالعات Kosalec و همکاران[۲٤و۲۵] و مطالعه Han و همکاران،[۱٤] به‌طور تقریبی مشابه MICهای به‌دست‌آمده از پژوهش کنونی بر روی مخمر *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا آفریکانا* بود و نشان‌دهنده‌ی موثر بودن ۲-فنیل اتانول در محدوده‌ی غلظت ٦۵۰ µg/ml تا ۷٦۷۰ µg/ml بر روی گونه‌های مخمری و رشته‌ای می‌باشد. برخلاف پژوهش کنونی در مطالعه‌ی Chauhan و همکاران، ۲-فنیل اتانول اثر قابل‌توجهی بر روی رشد و پایداری سلول‌های فاز مخمری *کاندیدا آلبیکنس* تا حدود ٤٪ (٤۰۰۰۰ µg/ml) نداشت و کاهش پایداری قابل‌توجه (۵۰-٤۰٪) در ۸-٦٪ (۸۰۰۰۰-٦۰۰۰۰ µg/ml) ۲-فنیل اتانول دیده شد.[٦] اختلافات مشاهده‌شده می‌تواند به‌دلیل تفاوت در سویه‌های مورد استفاده و همچنین تفاوت در نوع ۲-فنیل اتانول به‌کار برده شده (با منشای بیوسنتتیک و یا سنتتیک) در این مطالعات باشد.

براساس یافته‌های این پژوهش، محدوده‌ی MIC و MFC کلوتریمازول به‌تنهایی، بر روی گونه‌های *آلبیکنس* و *آفریکانا*، پس از ٤۸ ساعت ۱۲۸-۰/۵ µg/ml، میانگین MIC و MFC کلوتریمازول به‌ترتیب ۲٤/۷۳±۲۸/۸۷ µg/ml و ۳۰/۱۸±۳۰/۰۰٤ µg/ml، MIC50 و MIC90 به‌ترتیب ۱٦ و ٦٤ µg/ml بود (جداول ۱ و ۲).

در پژوهش Shojaei و همکاران بر روی ولوواژینیت کاندیدایی مزمن، در مورد کلوتریمازول، میانگین MIC ۷/۰۵ µg/ml، میانگین MFC ۲٤/۷ µg/ml و محدوده‌ی MIC ۳۲-۱ µg/ml بود[۲٦] که

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 12:21 IRDT on Tuesday September 17th 2019

میانگین MFC، Shojaei و همکاران به‌طور تقریبی با نتایج ما هم‌خوانی داشت ولی میانگین MIC و محدوده‌ی MIC مطالعه‌ی کنونی بالاتر از مقادیر گفته‌شده در مطالعه‌ی آن‌ها بود که این تفاوت می‌تواند ناشی از تفاوت در جامعه مورد مطالعه باشد. در پژوهش Kalkanci و همکاران محدوده‌ی MIC کلوتریمازول در بیماران باردار مبتلا به ولوواژینیت کاندیدایی عودکننده‌ی علامت‌دار µg/ml ٤- ۰/۰۳، MIC50 و MIC90 به‌ترتیب ۰/۱۲ و µg/ml ۰/۲۵ بود که بسیار پایین‌تر از محدوده و مقادیر گزارش‌شده در پژوهش کنونی بود.[۲۷] علت این تفاوت می‌تواند تفاوت در جامعه‌ی مورد مطالعه باشد.

همچنین در این مطالعه ۱۷/۵٪ نمونه‌ها حساس و ۸۲/۵٪ نمونه‌ها مقاوم به کلوتریمازول بودند (جدول ۵). برخلاف پژوهش کنونی در مطالعات Elfeky، Lakshmi، Wang و همکاران، بیشتر ایزوله‌ها حساس به کلوتریمازول بودند.[۲۸-۳۰] همچنین در مطالعات Shojaei، Mohamadi، Zafar و همکاران، ایزوله‌های مقاوم به‌ترتیب ۲۱٪، ۵۵٪ و ۲۷/۵٪ بودند[۲۶و۳۱و۳۲] که با مطالعه‌ی ما تفاوت داشت. اختلاف بین مطالعات یادشده و پژوهش کنونی می‌تواند به‌دلیل عدم وجود دستورکار ثابت و معین برای تفسیر نتایج حساسیت و یا مقاومت به کلوتریمازول و تفاوت در جمعیت مورد مطالعه باشد.

براساس مقادیر FICI به‌دست‌آمده و تفسیر نتایج آن،[۲۳] همبست کلوتریمازول و ۲-فنیل اتانول، برای شش نمونه‌ی مقاوم به کلوتریمازول، اثر هم‌افزایی (Synergism) را نشان داد. همچنین بین مقادیر MIC کلوتریمازول به‌تنهایی و در همبست، تفاوت معناداری وجود داشت (P=۰/۰۲۱). در نتیجه همبست کلوتریمازول و ۲-فنیل اتانول می‌تواند در افزایش اثر ضد قارچی کلوتریمازول موثر باشد (P=۰/۰۱۰۵). بااین‌حال آزمایش‌های سم‌شناسی دارویی و جستجو در مدل‌های حیوانی در این زمینه باید صورت گیرد.

در همبست کلوتریمازول و ۲-فنیل اتانول اثر هم‌افزایی مشاهده شد، همچنین میان مقادیر MIC کلوتریمازول به‌تنهایی و در همبست تفاوت معناداری وجود داشت (P=۰/۰۲۱).

سپاسگزاری: این پژوهش حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی تحت عنوان "بررسی اثر تداخلی آزول‌های ضد قارچ (کلوتریمازول، فلوکونازول و ایتراکونازول) و پلی‌ان (آمفوتریسین B) با اسید لینولییک کونژوگه و ۲-فنیل اتانول بر روی چند گونه‌ی کاندیدایی متداول" مصوب دانشگاه علوم پزشکی ایران در سال ۱۳۹٤ به کد ۹٤-۰۵-۳۰-۲۷۰۷۷ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی ایران اجرا شده است.

References

1. Zhang H, Fauré R, François JM, Blanc PJ, de Billerbeck GM. Xylosylation as an effective means for reducing yeast growth inhibition by 2-phenylethanol. *J Basic Microbiol* 2013;53(9):792-5.
2. Liu P, Cheng Y, Yang M, Liu Y, Chen K, Long CA, et al. Mechanisms of action for 2-phenylethanol isolated from Kloeckera apiculata in control of Penicillium molds of citrus fruits. *BMC Microbiol* 2014;14:242.
3. Han TL, Tumanov S, Cannon RD, Villas-Boas SG. Metabolic response of Candida albicans to phenylethyl alcohol under hyphae-inducing conditions. *PLoS One* 2013;8(8):e71364.
4. Findri-Guštek S, Petek MJ, Sarajlija H, Mršić G, Džepina AM, Oreščanin V. The correlation of the lifestyle and medical conditions with the vaginal infections and production of 2-phenylethanol. *Arch Gynecol Obstet* 2012;286(3):671-82.
5. Lester G. Inhibition of growth, synthesis, and permeability in *neurospora crassa* by phenethyl alcohol. *J Bacteriol* 1965;90(1):29-37.
6. Chauhan NM, Raut JS, Karuppayil SM. A morphogenetic regulatory role for ethyl alcohol in Candida albicans. *Mycoses* 2011;54(6):e697-703.
7. Martins M, Henriques M, Azeredo J, Rocha SM, Coimbra MA, Oliveira R. Candida species extracellular alcohols: production and effect in sessile cells. *J Basic Microbiol* 2010;50 Suppl 1:S89-97.
8. Egbe NE, Paget CM, Wang H, Ashe MP. Alcohols inhibit translation to regulate morphogenesis in *C. albicans*. *Fungal Genet Biol* 2015;77:50-60.
9. Martins M, Henriques M, Azeredo J, Rocha SM, Coimbra MA, Oliveira R. Morphogenesis control in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* through signaling molecules produced by planktonic and biofilm cells. *Eukaryot Cell* 2007;6(12):2429-36.
10. Campoy S, Adrio JL. Antifungals. *Biochem Pharmacol* 2017;133:86-96.
11. Loeffler J, Stevens DA. Antifungal drug resistance. *Clin Infect Dis* 2003;36(Suppl 1):S31-41.
12. Nguyen Y, Lee A, Fischer G. Management of chronic vulvovaginal candidiasis: a long term retrospective study. *Australas J Dermatol* 2017;58(4):e188-e192.
13. Mendling W, Brasch J, Cornely OA, Effendy I, Friese K, Ginter-Hanselmayer G, et al. Guideline: vulvovaginal candidosis (AWMF 015/072), S2k (excluding chronic mucocutaneous candidosis). *Mycoses* 2015;58 Suppl 1:1-15.
14. Neves NA, Carvalho LP, Lopes AC, Cruz A, Carvalho EM. Successful treatment of refractory recurrent vaginal candidiasis with cetirizine plus fluconazole. *J Low Genit Tract Dis* 2005;9(3):167-70.
15. Nazeri M, Mesdaghinia E, Moraveji SAR, Atabakhshiyan R, Soleymani F. Prevalence of vulvovaginal candidiasis and frequency of *Candida* speices in women referred to gynecology obstetrics clinic at Kashan-Iran since 2008 to 2010. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2012;22(86):262-9.
16. Habibian R, Jafarzadeh L, Shahriari K. Investigating the relationship between recurrent candidiasis with predisposing factors and

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 12:21 IRDT on Tuesday September 17th 2019

symptoms of disease. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2013;15(5):38-46.
17. Kavanagh K, editor. Medical Mycology: Cellular and Molecular Techniques. 1st ed. Chichester: John Wiley and Sons; 2006. P. 159-64.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. 3rd ed. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
19. Clément M, Tremblay J, Lange M, Thibodeau J, Belhumeur P. Whey-derived free fatty acids suppress the germination of Candida albicans in vitro. *FEMS Yeast Res* 2007;7(2):276-85.
20. Paulus W. Microbicides for the Protection of Materials: a Handbook. 1st ed. Netherlands Dordrecht: Springer; 2012. P. 449-51.
21. Zentz LC. Math for Pharmacy Technicians. 1st ed. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers; 2010. P. 37-52.
22. Pelletier R, Peter J, Antin C, Gonzalez C, Wood L, Walsh TJ. Emergence of resistance of Candida albicans to clotrimazole in human immunodeficiency virus-infected children: in vitro and clinical correlations. *J Clin Microbiol* 2000;38(4):1563-8.
23. Ernst EJ, Rogers PD, editors. Antifungal agents : methods and protocols. 1st ed. New Jersey: Humana Press; 2005. P. 143-52.
24. Kosalec I, Segvic Klaric M, Pepeljnjak S. Antifungal activity of 2-phenylethanol and levomenthol against molds from indoor air and damp dwellings. *Planta Med* 2007;73(9):118.
25. Kosalec I, Pepeljnjak S, Hadina S, Pinter L, Hajsig D. Antifungal activity of levomenthol, 2-phenylethanol, thymol and hydroquinone. 15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology; 2007.
26. Shojaei E, Falahati M, Zaini F, Kord Bache P, Rahimi Moghadam P, Aghamirian M, et al. A effects of several common antifungal drugs (clotrimazole, miconazole, fluconazole) alone and in combination with amphotericin B on Candida species isolated from chronic Candidal vulvovaginitis. *J Fasa Univ Med Sci* 2014;4(3):327-34.
27. Kalkanci A, Güzel AB, Khalil II, Aydin M, Ilkit M, Kuştimur S. Yeast vaginitis during pregnancy: susceptibility testing of 13 antifungal drugs and boric acid and the detection of four virulence factors. *Med Mycol* 2012;50(6):585-93.
28. ElFeky DS, Gohar NM, El-Seidi EA, Ezzat MM, AboElew SH. Species identification and antifungal susceptibility pattern of *Candida* isolates in cases of vulvovaginal candidiasis. *Alexandria J Med* 2016;52(3):269-77.
29. Lakshmi N, Kumari GR, Purushottham MD, Krishna PBM. Isolation and speciation of *Candida* from vulvovaginitis and their antifungal susceptibility. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 2015;4(12):121-9.
30. Wang FJ, Zhang D, Liu ZH, Wu WX, Bai HH, Dong HY. Species distribution and in vitro antifungal susceptibility of vulvovaginal candida isolates in china. *Chin Med J (Engl)* 2016;129(10):1161-5.
31. Mohamadi J, Havasian MR, Panahi J, Pakzad I. Antifungal drug resistance pattern of *Candida . spp* isolated from vaginitis in Ilam-Iran during 2013-2014. *Bioinformation* 2015;11(4):203-6.
32. Zafar S, Khurram M, Usman R, Khan F, Nasim R. Clotrimazole, fluconazole, ketoconazole and itraconazole susceptibilities of *Candida* species in vulvovaginitis. *J Med Sci* 2015;23(3):130-3.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 12:21 IRDT on Tuesday September 17th 2019

TUMJ Tehran University Medical Journal, February 2018; Vol. 75, No. 11: 839-847 Original Article

Study on synergistic effect of 2-phenylethanol and clotrimazole on *candida* species isolated from patients with chronic vulvovaginal candidiasis

Niloufar Majdabadi M.Sc.[1]
Mehraban Falahati Ph.D.[2*]
Fariba Heidarie-Kohan M.D.[3]
Shirin Farahyar Ph.D.[2]
Parvaneh Rahimi-Moghaddam Ph.D.[4]
Mahtab Ashrafi-Khozani M.Sc.[2]

1- Department of Parasitology and Mycology, International Campus, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3- Gynecology Clinic, Lolagar Hospital, Tehran, Iran.
4- Department of Pharmacology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[*] Corresponding author: Iran University of Medical Sciences, Shahid Hemmat Highway, Tehran, Iran.
Postal code: 1449614535
Tel: +98 21 88622653
E-mail: mehrabanfalahati@yahoo.com

Abstract

Received: 09 Aug. 2017 Revised: 16 Aug. 2017 Accepted: 21 Jan. 2018 Available online: 30 Jan. 2018

Background: 2-phenylethanol is a colorless and aromatic compound with antimicrobial effects which is used extensively in perfumes and cosmetics, as well as in the food industry. Chronic vulvovaginal candidiasis is a vulvovaginal inflammation which is caused by *Candida spp*. Resistance to clotrimazole which is one of the most common drugs in the treatment of this disease was reported in many patients. In order to improve the treatment, the effect of 2-phenyl ethanol was investigated in combination with clotrimazole on *Candida* species isolated from chronic vulvovaginal candidiasis.

Methods: This interventional study was performed in Iran University of Medical Sciences from February, 2016 until December, 2016 on *Candida* species isolated from women with chronic candidial vulvovaginitis who had been referred to Lolagar Hospital of Tehran. All specimens were examined by direct microscopy, culturing on *Candida* CHROMagar medium (to primary identification), sabouraud dextrose agar medium (to preservation the isolates) and determining the internal transcribed spacer (ITS) sequence (in order to final determination of *Candida* species). Then clotrimazole and 2-phenyl ethanol alone and in combination, was examined on isolated species, according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 protocol (micro-broth dilution method). Finally, findings were analyzed.

Results: From 40 detected strains of *Candida* species in this study, 95% were *Candida albicans* and 5% were *Candida africana*. The mean minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of clotrimazole were 24.73±28.87 µg/ml and 30.18±33.004 µg/ml, respectively and the mean MIC and MFC of 2-phenylethanol were 2580±932.38 µg/ml and 3200±1403.29 µg/ml, respectively. The MIC50 and MIC90 of clotrimazole were 16 and 64 µg/ml, respectively. The MIC50 and MIC90 of 2-phenylethanol were both 3200 µg/ml. Most of the isolates were resistant to clotrimazole (82.5%). In combination test, the mean MIC of 2-phenylethanol and clotrimazole alone were 3200±0 µg/ml and 56±40.16 µg/ml, respectively. The fractional inhibitory concentration index (FICI) range was 0.14-0.37. Also, there was a significant difference between clotrimazole MIC values alone and in combination (P= 0.021).

Conclusion: The synergistic effect was observed in combination of clotrimazole and 2-phenylethanol.

Keywords: 2-phenylethanol, antifungal agents, *candida* species, clotrimazole, drug resistance.