ارزیابی اثرات ضدقارچی اسانس روغنی گیاه سیر (Alliumsstadium) بر کاندیدا آلبیکنس،کاندیدا گلابراتا و کاندیدا تروپیکالیس در شرایط آزمایشگاهی

مریم میرآبادی[۱]، حمید آزادگان قمی[۲*]، مجتبی دیده‌دار[۳]

۱. کارشناسی‌ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، اراک، ایران

۲. استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، اراک، ایران

۳. استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، دانشکده پرستاری، گروه میکروبیولوژی، اراک، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۰۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۱۱)

چکیده

گونه‌های کاندیدایی بیماریزایی وسیعی در میزبان‌های انسانی و حیوانی دارند. عامل ۸۸درصد عفونت‌های قارچی بیمارستانی و چهارمین علت ایجاد عفونتهای خونی می‌باشد. سیر حاوی ترکیبات گوگردی و فروکتوزان می‌باشد. ترکیبات گوگردی از اسید آمینه‌ای به نام آلئین حاصل شده و این ترکیبات موجود در سیر به دو گروه عمده ترکیبات سولفوره و غیر سولفوره تقسیم می‌شوند. در این مطالعه نمونه‌های استاندارد بر روی محیط‌های سابورودکستروز آگار (Merck) و کروم آگار کاندیدا کشت داده شدند. اسانس استخراج شده در ظرف استریل درب دار(با توجه به فاز فرار) و در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری گردید. از روش اسانس گیری Hydro distillation با استفاده از دستگاه کلونجر استفاده شد. اندازه گیری قطر هاله عدم رشد و تست آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA در غلظت‌های مختلف اسانس سیر محاسبه گردید. در روش دیسک دیفیوژن غلظت ۲۵۰ میکروگرم نشان داد که کاندیدا آلبیکنس حساسیت بیشتری دارد. در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم کاندیدا گلابراتا در مقایسه با تروپیکالیس دارای تفاوت معناداری بوده است. بررسی نتیجه MIC نشان داد که قارچ کاندیدا آلبیکنس با MIC=0.4 دارای کمترین میزانMIC بوده و بنابراین حساس‌ترین قارچ نسبت به اسانس سیر می‌باشد. کاندیدا مهمترین عامل بیماریزا در کاندیدیازیس دهانی است، بنابر این کنترل عفونت‌های کاندیدا آلبیکنس و گلابراتا به همراه تشخیص و پیشگیری سریع کاندیدیازیس دارای اهمیت ویژه‌ای است. برای درمان دقیق، تعیین سطح گونه‌ای کاندیدا و آنالیز ژنوتیپی جدایه‌های کلینیکی جهت ارزیابی کاندیدیازیس و پیشگیری بویژه در بیماران بستری ضروری به نظر می‌رسد.

کلیدواژگان

اسانس روغنی سیر، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا.

*نویسنده مسئول: رایانامه azadeganqh@gmail.com

مقدمه

مخمرکاندیدا دارای گونه‌های عفونت‌زای متعددی است. از مهمترین آنها می‌توان به کاندیدا آلبیکنس، گلابراتا و تروپیکالیس اشاره نمود. این مخمر به عنوان یک ارگانیسم همزیست با سطوح مخاطی انسان شناخته شده است و در شرایط مساعد به شکل فرصت طلب اشکال مختلفی از بیماری را ایجاد کند. امروزه بیش از ۱۵۰ گونه کاندیدا شناسائی شده است که تنها برخی از آنها بیماریزا شناخته شده است. ۶۵درصد گونه‌های کاندیدا توان رشد در ۳۷درجه سانتی گراد را ندارند در حالی که توان رشد در این دما برای بیماریزائی یک عامل عفونی لازم است(۱). با گذر زمان تعداد عوامل بیماریزائی کاندیدایی رو به افزایش است که کشف گونه‌های جدید و تغییرات در طبقه بندی در آن دخیل است مثل *کاندیدا دابلینینسیس* (*Candida dubliniensis*) که از گونه آلبیکنس جدا شده و *کاندیدا گلابراتا* که بعدا به این خانواده ملحق شده است. گونه‌های کاندیدا بصورت ساپروب در محیط وجود دارد و اغلب برای انسان غیربیماریزا است ولی گونه‌های بیماریزا برای انسان و حیوانات بخصوص در بیماران با ضعف سیستم ایمنی در حال افزایش است (۲). در بین گونه‌های مخمری باارزش از نظر پزشکی، *کاندیدا آلبیکنس* قادر است در اشکال و فرم‌های مختلف رشد یابد و تحت شرایط رشد مناسب قادر به ایجاد کلامیدوکنیدی است. اشکال مخمری گرد، میسلیوم کاذب کوتاه و بلند، میسلیوم حقیقی و بلاستوکنیدی جوانه دار توسط *کاندیدا آلبیکنس* ایجاد می‌شود برای همین، اصطلاح پلئومورفیسم را درباره آن بکار می‌برند(۳). با شرایط متفاوت بر روی محیطهای کشت آزمایشگاهی قادر به القا تغییر شکل سلولهای مخمری به رشته‌ای هستند. همچنین ژنهای مختلفی شناسائی شده‌اند که در فرایندهای مورفولوژیک نقش دارند(۴). گونه‌های کاندیدایی بیماریزا در سطح وسیعی از میزبانهای انسانی و حیوانی وجود دارند. عامل ۸۸درصد عفونت‌های قارچی بیمارستانی و چهارمین علت ایجاد عفونتهای خونی در بین تمام عوامل ایجاد عفونت می‌باشد. انسان اغلب در زمان تولد در هنگام عبور از کانال زایمان و واژن آن را کسب می‌نماید و بصورت اولیه در دستگاه گوارشی مستقر می‌شوند. همچنین بصورت همزیست در واژن، مجاری ادراری (Urethra)، روی پوست و زیر ناخن انگشتان دست و پا یافت می‌شوند. *کاندیدا آلبیکنس* بعنوان مهمترین گونه بیماریزا در انسان،از منابع مختلف دیگری مثل: آب شیرین، هوا، آب دریا و خاک نیز جدا شده است. شرایط غیر بهداشتی گاهی باعث آلودگی محیط، غذا و سبزیجات به این مخمر می‌گردد(۵). فراوانی *کاندیدا آلبیکنس* و سایر گونه‌های جدا شده از خون، بطور قابل ملاحظه ای بر اساس سن بیمار، موقعیت محلی، منطقه ای یا جهانی متغیر است. در حالیکه *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا پاراپسیلوزیس* (*Candida Parapsilosis*) به عنوان عوامل عفونت‌های خونی بیمارستانی در بین کودکان غالب است، *کاندیدا گلابراتا* (*Candida glabrata*) در بین افراد مسن بیشتر مشاهده می‌شود و یا اینکه گونه غالب عفونت‌های خونی بیمارستانی در کشورهای آسیایی حوزه اقیانوس آرام *کاندیدا آلبیکنس* است درحالی که در آمریکای لاتین، *کاندیدا تروپیکالیس* و *کاندیدا پاراپسیلوزیس* شایع تر است. تفاوت در تعداد و انواع کاندیداهای عامل عفونت ممکن است با فاکتورهای سن بیمار، سطح سیستم ایمنی بیمار، در معرض بودن با داروهای ضدقارچی و روش‌های کنترل عفونت تحت تاثیر قرار بگیرد. بعنوان مثال استفاده از فلوکونازول بعنوان پروفیلاکسی ضدقارچی ممکن است عفونت‌های ایجاد شده بوسیله *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا کروزئی* را افزایش دهد و یا بی توجهی به

احتیاطات کنترل عفونت و عدم مراقبت مناسب از کاتترهای عروقی می‌تواند ابتلا به *کاندیدا پاراپسیلوزیس* را افزایش بدهد(۵). *کاندیدا آلبیکنس* در دامنه PH وسیعی از کمتر از ۲ تا حدود ۸ قادر به رشد است و در شرایط کم هوازی و بی هوازی رشد می‌کند. گلوکز، گالاکتوز و سوکروز مواد لازم برای رشد قارچ هستند. تجزیه کربوهیدراتها از طریق گلیکولیز و چرخه تری کربوکسیلیک اسید صورت می‌گیرد و واجد مسیر تنفسی متناوب القایی مقاوم به سیانید می‌باشد (۶). جذب اسیدهای آمینه و پپتیدها در *کاندیدا آلبیکنس* توسط پرمه آزهای (Permeases) با میل ترکیبی بالا و همچنین میل ترکیبی پایین صورت می‌گیرد (۷). آنزیم‌های متعددی در *کاندیدا آلبیکنس* مشخص شده که یکی از مهمترین آنها آنزیم آسپارتیل پروتئیناز ترشحی (Secreted aspartyl proteinase) است که علاوه بر *کاندیدا آلبیکنس*، توسط *کاندیدادابلینینسیس*، *کاندیداگیلیرموندی*، *کاندیدا پاراپسیلوزیس* و *کاندیدا تروپیکالیس* نیز تولید می‌شود. پروتئینازهای ترشحی کاندیدا موجب پروتئولیز غیر اختصاصی پروتئین‌های میزبان می‌شوند.این پروتئین‌ها در دفاع میزبان بر علیه عفونت نقش دارند(۸). *کاندیدا آلبیکنس* بصورت اشکال مخمری شکل تخم مرغی به قطر ۵-۳ میکرومتر و با قابلیت تولید جوانه یا بلاستوکنیدی، هایف حقیقی، لوله زایا و کلامیدوکنیدی انتهایی با دیواره ضخیم مشاهده می‌شود. در مقاطع هیستولوژی با هماتوکسیلین – ائوزین بطور ضعیف و با پریودیک اسید شیف، متنامین نیترات نقره و گریدلی به خوبی رنگ می‌گیرند. در محیط‌های کشت، کلنی‌های گنبدی شکل صاف، سفید تا کرم را ایجاد می‌کند. سیر حاوی ترکیبات گوگردی و فروکتوزان می‌باشد. ترکیبات گوگردی از اسید آمینه ای به نام آلئین حاصل می‌گردد. ترکیبات موجود در سیر به دو گروه عمده ترکیبات سولفوره و غیر سولفوره تقسیم می‌شوند. خواص دارویی سیر عمدتا به دلیل حضور ترکیب سولفورهای به نام آلیسین با نام شیمیایی s-methyl-l-cystein sulfoxide و اسیدهای آلی، کربوهیدراتها و ویتامینها می‌باشد. جزاء اصلی تشکیل دهنده اسانس سیر سه ماده دی آلیل سولفید، دی آلیل تری سولفید و متیل آلیل تری سولفید می‌باشد. این مواد باعث شکاف و جدایی در لایه خارجی لیپوساکارید قارچها و باکتری‌ها شده و به دنبال آن تجزیه غشاء خارجی و تراوش و جمع شدگی سیتوپلاسمی اتفاق می‌افتد (۱۶). بر اساس نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد اسانس سیر می‌تواند رشد *کاندیدا آلبیکنس و گلابراتا و تروپیکالیس* را با مکانیسم فوق مهار نماید و همچنین می‌تواند به عنوان یک عامل ضد قارچ موثر تجویز گردد (۱۶). هدف از این تحقیق بررسی اثرات ضدقارچی اسانس روغنی گیاه سیر بر روی سویه‌های *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا و کاندیدا تروپیکالیس* بوده است.

مواد و روش کار

در این مطالعه توصیفی که در سال ۱۳۹۵ انجام شد، اثر اسانس سیر به دو روش انتشار دیسک و ماکرودایلوشن براث مورد ارزیابی قرار گرفت و با توجه به نتایج بدست آمده، به عنوان راهی برای درمان کاندیدیازیس ارائه گردیده است. نمونه‌های کاندیداهای مورد مطالعه اعم از *کاندیدا آلبیکنس* به شماره PTCC 5027، *کاندیدا گلابراتا* PTCC 5297، و *تروپیکالیس* به شماره استاندارد ATCC 13803، مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌ها از کلکسیون گروه میکروبیولوژی داشنگاه آزاد اسلامی اراک تهیه گردید. در این مطالعه نمونه‌های استاندارد بر روی محیط‌های سابورودکستروز آگار (Merck) و کروم آگار کاندیدا (Paris company) کشت داده شد. همچنین از نمونه ارسالی یک اسمیر تهیه شده و بعد از فیکس کردن با

متانول، رنگ آمیزی گیمسا انجام گرفته و از نظر مخمرهای جوانه دار یا بدون جوانه و هایف حقیقی یا کاذب مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به اینکه در این محیط کشت از مواد کروموژنیک استفاده می‌شود، کلنی‌های رشد کرده دارای رنگ‌های مختلفی می‌باشند. این محیط یک تشخیص احتمالی از روی رنگ و فرم کلنی را امکان پذیر می‌سازد. برای بررسی ایجاد کلامیدوکنیدی در مخمرها از محیط کشت کورن میل آگار و یا دانه برنج حاوی توئین ۸۰درصد استفاده شد. *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا دابلینینسیس* می‌توانند در محیط کورن میل آگار کلامیدوکنیدی ایجاد کنند، همچنین *کاندیدا گلابراتا* در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و پس از انکوباسیون در دمای ۴ درجه سلسیوس می‌تواند کلامیدوکنیدی ایجاد کند با این تفاوت که دیواره ایجاد شده در *کاندیدا گلابراتا* نازک تر از *کاندیدا آلبیکنس* می‌باشد. دراین مطالعه، از محیط کشت کورن میل آگار حاوی یک درصد توئین ۸۰ (MERCK) استفاده شد (۱۷). گیاه سیر خریداری و پس از تایید خالص بودن، جهت تهیه اسانس این گیاه، ۵۰ گرم از پودر آسیاب شده را داخل بالن ۲ لیتری ریخته و ۶۰۰ سی سی آب مقطر به آن اضافه و با استفاده از دستگاه کلونجر (Clevenger)، پس از ۴ ساعت اسانس استخراج گردید. اسانس استخراج شده در ظرف استریل درب دار(با توجه به فاز فرار) و در ۴ درجه سانتی گراد جهت انجام آزمایشات نگهداری گردید. برای این کار از روش اسانس گیری HYDRO DISTILLATION با استفاده از دستگاه کلونجر استفاده گردید. مقدار ۱۰۰گرم از گیاه خرد شده را در بالن ژوژه دستگاه ریخته و پس از آن ۷۰۰میلی لیتر آب مقطر روی آن می‌ریزیم..برای این کار باید از آب مقطر به دلیل نداشتن املاح استفاده کرد تا تحت تاثیر حرارت روی اسانس اثر نگذارد. به منظور انجام آزمایش تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد MIC از روش پیشنهادی NCCLS National Committee on (Clinical Laboratory Standards) و پروتکل M44-A عمل شد(۱۰) و بر اساس گزارش CLSI، نتایج این روش ۹۵ درصد شبیه به نتایج تست هایی مثل Broth dilution و E.test می‌باشد. همچنین از محیط کشت مولر هینتون حاوی ۲درصد قند گلوکز به منظور افزایش رشد کاندیدا به محیط کشت اضافه گردید. سوسپانسیون استاندارد مخمری با غلظت 10^6 cfu/ml از کشت تازه در لوله‌های استریل حاوی سرم فیزیولوژی با استفاده از روش اسپکتروفوتومتریک تهیه گردید، سپس با استفاده از سواپ و غوطه ور کردن آن در درون سوسپانسیون و انتقال سواپ بر روی محیط کشت، سلول‌های مخمری را بصورت کاملا یکنواخت و در تمام جهات کشت داده و در ادامه ۳۰ میکرولیتر از اسانس بر روی کاغذهای بلانک استریل (شرکت پادتن طب) اضافه کرده و پس از جذب شدن اسانس در کاغذ بلانک، آنرا با پنس استریل در مرکز پلیت قرار داده و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در ۳۵ درجه انکوبه کردیم، پس از دوره انکوباسیون قطر منطقه ممانعت از رشد، بر حسب میلی متر اندازه گیری شد (۱۱). این آزمایش بر روی هر ۳ کاندیدا انجام گرفت و نتایج یادداشت گردید. برای تهیه رقت از اسانس بر مبنای مطالعات پیشین از رنج پایین تا بالا، رقت دو برابر تهیه کرده و برای تهیه هر رقت از اسانس از محیط سابورودکستروز براث استفاده کرده و به منظور حل شدن و همگن شدن اسانس در این محیط از DMSO به نسبت ۱/۱۰ استفاده کردیم و در ادامه از نسبت ۱/۱ رقت اسانس و سوسپانسیون استاندارد مخمری برای ارزیابی حساسیت مخمری استفاده شد. کاندیداها در محیط سابورو دکستروز آگار کشت مجدد داده شد و به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سوسپانسیون تلقیحی می‌بایست از طریق برداشت ۵ کلنی (با قطری حدود ۱ میلی متر) از

کشت تازه در داخل ۱۰ سی سی سرم فیزیولوژی (سالین ۰/۸۵درصد) آماده می‌گردید. سوسپانسیون فوق به مدت ۱۵ثانیه ورتکس شده و میزان تراکم سلولی از طریق روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۳۰ نانومتر و یا از طریق روش نیم مک فارلند تعیین تراکم گردید، به طوریکه در نهایت مقدار سلول‌های مخمری ۵×۱۰^{۶} - ۱×۱۰^{۶} سلول در هر میلی لیتر شد. سپس از سوسپانسیون فوق به ترتیب رقت‌های ۱/۱۰۰ سپس ۱/۲۰ تهیه کرده به نحوی که تراکم نهایی سلول‌های مخمری در هر میلیلیتر CFU/mL $۵-۲/۵\times۱۰^{۳}$. بدست آمد. داده‌های حاصل به طور جداگانه تحلیل آماری شد. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSSوبه روش آنالیز واریانس یکطرفه یا ANOVA صورت پذیرفت و رسم نمودارها نیز با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد.

نتایج

نمونه‌های استاندارد در محیط سابورو دکستروز آگار و کروم اگار رشد کرده و در محیط کشت کروم آگار طیفی از رنگها بر اثر رشد کاندیداها ایجاد می‌شود. مبنای تشخیص برای *کاندیدا آلبیکنس* در این محیط کشت، رنگ سبز می‌باشد این رنگ سبز می‌تواند بصورت سبز کمرنگ، سبز روشن، سبز آبی، سبز تیره، سبز لجنی و تیره و با شکل کلنی صاف، خشن وچروکیده دیده شود.

اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد و تست آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA در غلظت‌های مختلف اسانس سیر محاسبه گردید و وقتی هاله عدم رشد بزرگتر است یعنی قارچ نسبت به ماده ضد میکروبی حساس تر است بنابراین غلظت MIC و MFC پایین تری نیز دارد یعنی اسانس در غلظت کمتر اثر ضد میکروبی بیشتر دارد و میکروب در غلظت پایین تری از بین می‌رود. مطابق نتایج انجام تست آنالیز واریانس یک طرفه Anova نشان می‌دهد: هاله عدم رشد ایجاد شده در اثر اسانس سیر(غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در قارچ *کاندیدا آلبیکنس* در مقایسه با قارچ *کاندیدا تروپیکالیس* بزرگتر بوده اما مقایسه آماری آنها نشان می‌دهد که این تفاوت اندازه هاله در بین قارچها معنی‌دار نبوده است (P value >0.05). همچنین هاله عدم رشد ایجاد شده در اثر اسانس سیر(غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در قارچ *کاندیدا تروپیکالیس* در مقایسه با قارچ *کاندیدا گلابراتا* بزرگتر بوده اما مقایسه آماری آنها نشان می‌دهد که این تفاوت اندازه هاله در بین این دو قارچ معنی دار نمی‌باشد (P value >0.05). هاله عدم رشد ایجاد شده در اثر اسانس سیر(غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در قارچ *کاندیدا آلبیکنس* در مقایسه با قارچ *کاندیدا گلابراتا* بزرگتر بوده و مقایسه آماری آنها نشان می‌دهد که تفاوت اندازه هاله در بین این دو گونه معنادار است (Pvalue =0.0386).

بررسی نتایج نشان داد هاله عدم رشد ایجاد شده در اثر اسانس سیر(غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در قارچ *کاندیدا تروپیکالیس* در مقایسه با قارچ *کاندیدا گلابراتا* بزرگتر بوده اما مقایسه آماری آنها نشان می‌دهد که این تفاوت اندازه هاله در بین این دو قارچ معنی دار نیست (P value >0.05). هاله عدم رشد ایجاد شده در اثر اسانس سیر (غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در قارچ *کاندیدا آلبیکنس* در مقایسه با قارچ *کاندیدا گلابراتا* بزرگتر بوده و مقایسه آماری آنها نشان می‌دهد تفاوت اندازه هاله در بین این دو گونه معنادار است (Pvalue =0.0273). هاله عدم رشد ایجادشده در اثر اسانس سیر (غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلیلیتر) در قارچ *کاندیدا آلبیکنس* در مقایسه با قارچ *کاندیدا تروپیکالیس* بزرگتر بوده و مقایسه آماری آنها نشان می‌دهد تفاوت اندازه هاله در بین *آلبیکنس و تروپیکالیس* معنادار است (Pvalue =0.0488).

انجام تست آنالیز واریانس یک طرفه Anova و مقایسه نتایج نشان می‌دهد: هاله عدم رشد ایجاد شده در اثر اسانس سیر(غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در قارچ *کاندیدا آلبیکنس* در مقایسه با قارچ *کاندیدا گلابراتا* بزرگتر بوده و مقایسه آماری آنها نشان می‌دهد که تفاوت اندازه هاله در بین این دو قارچ معنی دار است (P value =0.004). هاله عدم رشد ایجاد شده در اثر اسانس سیر (غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در قارچ *کاندیدا آلبیکنس* در مقایسه با قارچ *کاندیدا تروپیکالیس* بزرگتر بوده و مقایسه آماری آنها نشان می‌دهد که تفاوت اندازه هاله در بین این دو مخمر معنی دار است (P value =0.0425). هاله عدم رشد ایجاد شده در اثر اسانس سیر (غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در قارچ *کاندیدا تروپیکالیس* در مقایسه با قارچ *کاندیدا گلابراتا* بزرگتر بوده و مقایسه آماری آنها نشان می‌دهد که تفاوت اندازه هاله در بین این دو گونه معنادار است (P value =0.0383).

نتایج MIC و MFC

جهت بررسی اثر اسانس با استفاده از روش لوله‌ای (Macro dilution Broth) حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد قارچ MIC (Minimum Inhibitory concentration) و جهت تعیین MFC (Minimum Fungicidal Concentration) حداقل غلظت کشندگی قارچ علیه قارچهای مورد آزمایش از لوله‌های فوق کشت صورت گرفته است که نتایج در جدول ۱ نشان داده شده است. مقایسهMIC ایجاد شده در اثر اسانس سیر نشان می‌دهد: قارچ *کاندیدا آلبیکنس* با MIC=0.4 دارای کمترین میزانMIC بوده و بنابراین حساس ترین قارچ به اسانس سیر می‌باشد یعنی به عبارت دیگر کمترین غلظت اسانس سیر جهت ممانعت از رشد قارچها بر روی این مخمر موثر بوده است. همچنین قارچ *کاندیدا تروپیکالیس* با MIC=0.5 دارای میزانMIC کمتری نسبت به *کاندیدا گلابراتا* با MIC=0.6 بوده و بنابراین نسبت به *گلابراتا* حساس تر نسبت به اسانس سیر می‌باشد. مقایسهMFC ایجاد شده در اثر اسانس سیر نشان می‌دهد: قارچ *کاندیدا آلبیکنس* با MFC=0.7 دارای کمترین میزان MFC بوده و بنابراین حساس ترین قارچ به اسانس سیر می‌باشد یعنی به عبارت دیگر کمترین غلظت اسانس سیر جهت کشتن قارچها بر روی این قارچ موثر است.

جدول ۱- غلظت تاثیر اسانس سیر بر روی قارچهای مورد مطالعه به روش دیسک دیفیوژن و ماکرودایلوشن بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر

	قطر هاله با غلظت 250 µg/mL	قطر هاله با غلظت 500 µg/mL	قطر هاله با غلظت 1000 µg/mL	غلظت MIC بر حسب µg/ mL	غلظت MFC بر حسب µg/ mL
C.albicans	(mm)۱۲	۲۲/۵	۴۲	۰/۴	۰/۷
	۸/۵	۱۷	۳۰		
	۹	۱۸/۲	۳۵		
C,glabrata	(mm)۶/۴	۱۱	۲۰	۰/۶	۰/۸
	۸	۱۴/۲	۲۷		
	۷/۵	۱۳	۲۴		
C.tropicalis	(mm)۷	۱۲/۵	۲۸/۵	۰/۵	۰/۸
	۸/۲	۱۵	۳۳		
	۹	۱۶/۵	۳۵		

بحث و نتیجه‌گیری

این تحقیق به صورت مقطعی و در یک فاصله زمانی ۵ ماهه و در سال ۹۵- ۱۳۹۴ انجام گرفت. هدف اصلی در این مطالعه، شناسایی تاثیر اسانس سیر بر روی قارچهای *کاندیدا آلبیکنس، گلابراتا و تروپیکالیس* و تعیین حساسیت اسانس زنیان و تعیین MIC و MFC بر روی این جدایه‌ها بود. امروزه گزارشات فراوانی مبنی بر شکست در درمان مبتلایان به فرمهای بالینی مختلف کاندیدیازیس ارائه شده است (۱۲). داروهای ضدقارچی با فرمولاسیون‌های متفاوت برای درمان در دسترس است، اما در بسیاری از موارد به دلیل بی پاسخی نسبت به درمان، بیماری به اشکال مزمن یا حاد تبدیل شده و گاهی عودهای مکرر دیده می‌شود. Nasir Wabe و همکاران (۲۰۱۱) در مورد الگوی حساسیت ایزوله‌های *کاندیدا آلبیکنس* جدا شده از دهان بیماران مبتلا به HIV در اتیوپی مطالعه ای را انجام دادند. ۴۲ ایزوله جدا شده، با روش میکرودایلوشن براث (NCCLS) بررسی گردید و میزان مقاومت۱۱/۹ درصدی برای فلوکونازول، ۷/۱ درصدی برای کتوکونازول، ۲/۳ درصدی برای آمفوتریسین B و ۴/۷ درصدی برای نیستاتین گزارش شده است (۱۳). همچنین نیاز به مصرف طولانی مدت داروهای ضدقارچی که خود منجر به بروز عوارض جانبی ناشی از مصرف آنها می‌شود، محدودیت هایی را در استفاده از این قبیل ترکیبات ضدقارچی بوجود آورده است(۱۴). مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده است که اغلب عفونت‌های مهم قارچی توسط گونه‌های مقاوم به داروهای ضدقارچی ایجاد می‌شود. این موضوع به خصوص در مورد *کاندیدا آلبیکنس* و مقاومت آنها نسبت به داروی فلوکونازول مورد تایید قرار گرفته است (۱۵). به همین دلیل در سال‌های اخیر توجه محققین به سمت یافتن ترکیبات طبیعی و گیاهی با خواص مهارکنندگی رشد قارچها معطوف شده است و انواع مختلفی از گیاهان و عصاره‌ها و اسانس‌های آنها با موفقیت در مهار رشد قارچها در شرایط آزمایشگاهی بکار گرفته شده است (۱۷). در روش دیسک دیفیوژن مقدار ۲۵۰ و ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم از این اسانس در روی محیط کشت، منطقه ممانعت از رشد قابل قبولی را در برابر *کاندیدا آلبیکنس و گلابراتا و تروپیکالیس* را ایجاد نمود. مقدار ۲۵۰ میکروگرم نشان داد که تاثیر اسانس بر روی این سه مخمر در مقایسه باهم در ایجاد هاله عدم رشد تفاوت معنی داری نداشته ولی مقایسه نتیجه *آلبیکنس با گلابراتا* حاکی از تفاوت معنادار بوده و *آلبیکنس* حساسیت بیشتری بروز داده است. در غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم نتیجه آلبیکنس در مقایسه با گلابراتا و تروپیکالیس نشان دهنده تفاوت معناداری بوده است. در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم *کاندیدا گلابراتا* در مقایسه با *تروپیکالیس* دارای تفاوت معناداری بوده است. بررسی نتیجه آزمایش MIC نشان می‌دهد که قارچ *کاندیدا آلبیکنس* با MIC=0.4 دارای کمترین میزانMIC بوده و بنابراین حساس ترین قارچ به اسانس سیر می‌باشد یعنی به عبارت دیگر کمترین غلظت اسانس سیر جهت ممانعت از رشد قارچها بر روی این مخمر موثر بوده است. همچنین قارچ *کاندیدا تروپیکالیس* با MIC=0.5 دارای میزانMIC کمتری نسبت به *کاندیدا گلابراتا* با MIC=0.6 بوده و بنابراین نسبت به *گلابراتا* حساس تر نسبت به اسانس سیر می‌باشد. در نتیجه MFC مشخص گردید که *کاندیدا آلبیکنس* در میزان ۰/۷ میکروگرم بیشترین تاثیر را دارد و در مجموع مشخص گردید که اسانس سیر نسبت به *کاندیدا آلبیکنس* بیشترین تاثیر را در مقایسه با دو گونه دیگر دارد. ایاکوبلیس و همکاران فعالیت ضد میکروبی اسانس زنیان را به روش آگار دیفیوژن بررسی کردند و اثرات مهاری نسبتا بالای آن را علیه رودوترولا، اروینیا، گزانتوموناسو اگروباکتریوم

مشاهده کردند(۸). همچنین Saksena و همکاران نیز فعالیت ضدقارچی زنیان را علیه درماتوفیت‌ها مورد تایید قرار دادند(۱۶). Mahboubi و همکاران (۲۰۱۱) اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی دو اسانس زنیان و آویشن را بر روی تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی (ATCC) و همچنین *کاندیدا آلبیکنس* ATCC 10231، *کاندیدا گلابراتا* و *آسپرجیلوس* را به روش میکرودایلوشن براث گزارش کردند. طبق گزارشات این مطالعه، اسانس زنیان اثر ضد میکروبی بالاتری نسبت به آویشن را داشت(۱۱). این موضوع به خوبی پذیرفته شده است که *کاندیدا* مهمترین عامل بیماری زا در کاندیدیازیس دهانی است بنابراین کنترل عفونت‌های *کاندیدا آلبیکنس* و *گلابراتا* به همراه تشخیص و پیشگیری سریع کاندیدیازیس دارای اهمیت ویژه ای است. برای درمان دقیق، تعیین سطح گونه ای کاندیدا و آنالیز ژنوتیپی جدایه‌های کلینیکی جهت ارزیابی کاندیدیازیس و پیشگیری بویژه در بیماران بستری ضروری به نظر می‌رسد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از گروه پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک اعلام می‌دارند.

منابع و مآخذ

1. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. Clinical mycology, Elsevier Science, USA, 1st edition, (2003): pages 195-240.
2. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. Postgrad Med J. 2002;78(922):455-9.
3. Bougnoux ME, Dupont C, Turner L, Rouveix E, Dorra M, Nicolas-Chanoine MH. Mixed Candida glabrata and Candida albicans disseminated candidiasis in a heroin addict. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1997;16(8):598-600.
4. Costa CR, de Lemos JA, Passos XS, de Araújo CR, Cohen AJ, e Souza LK, et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of oral Candida isolates from HIV-infected patients in the antiretroviral therapy era. Mycopathologia. 2006; 162(1):45.
5. Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassoulian-Barrett SL, LaFe K, Yarfitz SL, et al. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. J Clin Microbiol. 2000;38(6):2302-10.
6. Dassanayake RS, Ellepola AN, Samaranayake YH, Samaranayak LP. Molecular heterogeneity of fluconazole-resistant and-susceptible oral Candida albicans isolates within a single geographic locale. Apmis. 2002;110(4):315-24.
7. Edwards Jr JE. Candida species. Candida species.. 1990(Ed. 3):1943-58.
8. Iacobellis NS, Lo Cantore P, Capasso F, Senatore F. Antibacterial activity of Cuminum cyminum L. and Carum carvi L.essential oils. J Agri Food Chem. 2005:53(1):57-61.
9. Kwon-Chang KJ, Bennett JE, Medical Mycology, Candidiasis Lea&Febiger, Philadelpheia, 1992,p 280.
10. Magee PT, Bowdin LI, Staudinger JE. Comparison of molecular typing methods for Candida albicans. J Clin Microbiol. 1992;30(10):2674-9.
11. Mahboubi M, Kazempour N. Chemical composition and antimicrobial activity of Satureja hortensis and Trachyspermum copticum essential oil. Iranian J Microbiol. 2011;3(4):194-200.
12. Morschhäuser J. The genetic basis of fluconazole resistance development in Candida albicans. Biochim Biophys Acta. 2002;1587(2):240-8.
13. Wabe NT, Hussein J, Suleman S, Abdella K. In vitro antifungal susceptibility of Candida albicans isolates from oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus in Ethiopia. J Exp Integ Med. 2011;1:265-71.
14. NCCLS (2002) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts;Approved Standard-Second Edition. NCCLS Document M27-A2, NCCLS, Wayne, PA.
15. Pinjon E, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D. Simple, Inexpensive, Reliable Method for Differentiation of Candida dubliniensis from Candida albicans. J Clin Microbiol. 1998;36(7):2093-5..
16. Saksena NK, Saksena S. Enhancememt in the antifungal activity of some essential oil in Combination against some dermatophytes. Indian Perfumer.1984: 28(1): 42-5.
17. Rahimi G, Khodavandi A, Jannesar R, Alizadeh F, Yaghobi R, Sadri A. Evaluation of antifungal effects of ethanolic and aqueous extracts of Zataria multiflora herb in the pathogenic yeast Candida albicans biofilm inhibition. J Pure Appl Microbiol. 2014;8(6):4559-64.