

مقایسه اثر ضد قارچی فلوکونازول به تنهایی و همراه با ذرات نانوقره بر روی کاندیداهای مولد ولوواژینیت مزمن کاندیدیایی

شیمنا نوذری: دانشجوی کارشناسی ارشد قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. shimanozari@yahoo.com
 دکتر فریبا حیدری کهن: استادیار و متخصص زنان و زایمان. دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. dr_heidarie@yahoo.com
 مهتاب اشرفی خوزانی: کارشناسی ارشد قارچ شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. asm2345@yahoo.com
 فرزانه احمدی: دانشجوی کارشناسی ارشد آمار، دانشکده پیراپزشکی دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران. ahmadi.farzan@gmail.com
 زینب قاسمی: دانشجوی کارشناسی ارشد قارچ شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. zeinabghasemi@yahoo.com
 صنم نامی: کارشناسی ارشد قارچ شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. sanamnami@yahoo.com
 *دکتر مهربان فلاحتی: دانشیار گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران. (*مؤلف مسئول). merabanfalahati@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۱/۲۶

تاریخ دریافت: ۹۰/۹/۱

چکیده

زمینه و هدف: ولوواژینیت کاندیدیایی (VVC= Vulvovaginitis Candidal)، عفونت دستگاه تناسلی زنان است که بر اثر رشد بیش از حد گونه‌های کاندیدا به ویژه کاندیدا آلبیکنس (Candida albicans) ایجاد می‌شود و گاهی به صورت مزمن و عودکننده در می‌آید. فلوکونازول یکی از داروهای متداول است که در درمان این بیماری به کار می‌رود. البته مقاومت نسبت به این دارو نیز دیده شده است. بنابراین ما برآن شدیم تا در جهت بهبود درمان، اثر توأم فلوکونازول با ذرات نانوقره را بر روی گونه‌های کاندیدیایی جداسازی شده از ولوواژینیت مزمن و عودکننده کاندیدیایی بررسی کنیم.

روش کار: این مطالعه یک روش آزمایشگاهی تجربی است که بر روی ۳۰ نمونه از بیماران کاندیدیایی مزمن انجام شده است. نمونه‌ها مورد آزمایش مستقیم، کشت و آزمایش‌های تکمیلی برای شناسایی گونه‌های مختلف کاندیدا از قبیل کشت روی کاندیدا کروم آگار (Chrome agar)، جرم تیوب (Germ tube)، تست دما و آزمایش جذب قندها (Sugar Assimilation API 20 AUX) قرار گرفتند و سپس فلوکونازول و نانوسیلور هر یک به تنهایی و همراه با یکدیگر بر روی هر کدام از گونه‌ها به روش میکروداپلوشن برات (Broth (Dillution) آزمایش و یافته‌ها بر اساس رگرسیون لجستیک و آزمون من-ویتنی بیان شد.

یافته‌ها: در بررسی ما ۳۰ نمونه ولوواژینیت مزمن کاندیدیایی شناخته شد که عامل آن‌ها به ترتیب فراوانی عبارت از کاندیدا آلبیکنس، گلابرات (Glabrata)، کروزی (Krusei)، تروپیکالیس (Tropicalis)، پاراپسیلوزیس (Parapsilosis) و فاماتا (Famata) بودند. هم چنین یافته‌ها نشان داد که فلوکونازول در دامنه گسترده‌ای از غلظت، بین ۴-۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر، قادر به مهار رشد گونه‌های کاندیدا می‌باشد. هم چنین فعالیت ضد قارچی آن، همراه با نانوسیلور در مقایسه با کاربرد تنهایی آن افزایش داشت.

نتیجه‌گیری: بهره‌گیری از آزمایشگاه برای تشخیص صحیح عفونت و نیز تعیین حساسیت در آزمایشگاه و تجویز نانوسیلور همراه با فلوکونازول در فرمولاسیون‌های داروهای موضعی برای درمان کاندیدیازیس مزمن واژینال و جلوگیری از موارد عود کننده می‌تواند مفید باشد.

کلیدواژه‌ها: فلوکونازول، نانوسیلور، حساسیت ضد قارچی، اثر هم افزایی دارو (Synergism)، گونه‌های کاندیدا.

مقدمه

ولوواژینیت کاندیدیایی (VVC) بیماری است که در اثر رشد غیر طبیعی مخمرها در مخاط دستگاه تناسلی زنان ایجاد می‌شود (۱). این بیماری در اغلب خانم‌هایی که مراقبت‌های پزشکی دریافت می‌کنند، معمول می‌باشد و سالانه بیش از ۱۰ میلیون نفر به این عارضه مبتلا می‌شوند و به علت کاندیدا آلبیکنس و سایر گونه‌های کاندیدا ایجاد می‌شود (۲-۴).

فراورده‌های دارویی برای درمان کاندیدیازیس وجود دارد از قبیل قرص‌های واژینال نیستاتین، ایمیدازول‌ها نظیر کرم‌های واژینال کلوتریمازول که به صورت معمولی و گسترده در کشورما استفاده می‌شود و فلوکونازول که یک ترکیب آزول خوراکی است که از سنتز (Synthesis) ارگسترول (Ergosterol) قارچ ممانعت می‌کند و به صورت تک دوز در درمان کاندیدیاز واژینال تجویز می‌گردد. بنابراین طول دوره درمان طولانی و

سال ۹۰-۱۳۸۹ انجام دهیم.

روش کار

این یک مطالعه تجربی بود که بر روی کاندیداهای جدا شده از زنان مبتلا به ولوواژینیت مزمن مراجعه کننده به بیمارستان لولاگر طی مراحل زیر انجام شد.

تهیه نمونه‌های مورد آزمایش: ابتدا زنانی که دارای علایمی مثل خارش، سوزش، ترشحات غلیظ پنیری شکل، قرمزی ولوواژن بودند و با شکایت از واژینیت کاندیدیایی و در طی یکسال بیش از ۳ بار به بیمارستان مراجعه نموده بودند و پزشک آن‌ها را مشخص و معرفی می‌نمود، مورد آزمایش قرار می‌گرفتند، از ترشحات واژن آن‌ها توسط سوآب استریل نمونه برداری شده، در یک میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل نگهداری کرده و به آزمایشگاه منتقل می‌شد. برای تایید آزمایشگاهی واژینیت کاندیدیایی، از نمونه، لام مرطوب تهیه و مطالعه میکروسکوپی می‌شد. هم چنین در شرایط استریل با لوپ (Loop) استاندارد روی پلیت (Plate) محتوی محیط کروم آگار کاندیدا منتقل کردیم و بعد از ۳۶ ساعت کلونی‌ها را شمارش کردیم. پلیت‌هایی را که نماینده تعداد کلونی بیش از ۱۰۰۰ در یک میلی لیتر بودند و لام میکروسکوپی آن‌ها مثبت بود، به عنوان نمونه مثبت تلقی می‌شدند و به این ترتیب از میان آن‌ها ۳۰ بیمار، جمعیت پژوهشی و نمونه ترشحات آن‌ها گزاره این جستار شدند(۵).

تشخیص نمونه‌ها: با کشت ترشحات روی محیط کاندیدا کروم آگار و رویش حاصل از آن بعضی از گونه‌های کاندیدا شناسایی شد. برای شناسایی کامل‌تر گونه‌ها از تست‌های تکمیلی استفاده شد که شامل موارد زیر بودند: (۱) تست جرم تیوب (۲) تولید کلامیدوکونیدی در محیط کورن میل آگار حاوی توپین ۸۰، (۳) تست تحمل دما و (۴) تست جذب قندها توسط مخمرها با استفاده از کیت API 20 AUX(۵).

عوارض جانبی آن‌ها باعث می‌شود، بیمار به محض کاهش علائم و نشانه‌ها، درمان را به طور ناقص رها کند (۵-۷). هم اکنون مشخص شده است که نقره در اندازه نانو به صورت چشمگیری دارای خواص فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکال است. خواص این نانو ذرات به علت افزایش دسترسی‌شان به بافت، سلول‌ها و مولکول‌های بیولوژیکی در بدن انسان می‌باشد (۹۸).

در مطالعه دیگری، اثر ضد میکروبی نانونقره علیه ایزوله‌های درماتوفیت‌ها و کاندیدا نشان داده شده است (۱۰). استفاده هم زمان از ۲ یا چند عوامل ضد میکروبیال دلایل خاصی دارد و در زمان‌های معینی سفارش شده است. دلایل عمده برای استفاده از ترکیب ۲ یا چند آنتی بیوتیک عبارت است از: (۱) حداقل مقاومت باکتری‌ها را به تأخیر می‌اندازد و (۲) ترکیبات آنتی بیوتیکی ممکن است اثرات هم افزایی مطلوبی را در درمان عفونت‌های باکتریال تولید کنند. بر این اساس ۲ روش مرسوم از داخل آزمایشگاهی آنتی بیوتیک، تحت عنوان روش Checker board و روش Curve time killing ایجاد شد (۱۱). در چند سال اخیر، مقاومت گونه‌های کاندیدا به فلوکونازول به عنوان یک مشکل عمده در درمان عفونت‌های کاندیدیایی مطرح شده است. بنابراین درمان همراهی فلوکونازول با داروهای دیگر، با کاهش مشکلات کلیوی و معالجه عفونت همراه است. مثلاً فعالیت ضد قارچی فلوکونازول به تنهایی و در همراه با لواستاتین و تأثیر آن بر روی بیان ژن در مسیر بیوسنتز ارگسترول کاندیدا آلبیکنیس ارزیابی شد. مطالعات بر روی حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد نشان داد که لواستاتین به صورت هم افزایی با فلوکونازول در شرایط آزمایشگاهی عمل می‌کند (۱۲و۱۳).

در نتیجه با شیوع نسبتاً بالای این بیماری و درمان‌های ناقص آن و کاهش اثرات سمی ناشی از ترکیبات ضد قارچی سنتتیک (Synthetic) مانند فلوکونازول، بر آن شدیم تا مطالعه‌ای را به منظور بررسی تأثیر داروی فلوکونازول به تنهایی و همراه با نانوسیلور در واژینیت مزمن کاندیدیایی روی مراجعین به مرکز درمانی لولاگر در شهر تهران در

۰/۱۲۸ گرم از پودر فلوکونازول تهیه شده از شرکت سیگما با ترازوی حساس وزن شد، در ۱۰cc آب مقطر ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت تا کاملاً حل شود و محلول دارویی با غلظت $1280 \mu\text{g/mL}$ به دست آید. سپس برای تهیه محلول دارویی جهت اندازه‌گیری MIC، ۱ میلی لیتر از محلول استوک دارویی مورد آزمایش را با ۹mL از محیط سابورو مایع استریل، رقیق کرده، غلظت $128 \mu\text{g/mL}$ را به دست آمد. برای تهیه رقت های پشت سر هم از ۱۲۸ تا ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر آن را با سابورو رقیق نمودیم (۱۴-۱۶).

اندازه‌گیری MIC: در این مرحله از پلیت‌های استریل ۹۶ خانهای U شکل دردار استفاده شد. ۵۰ میکرولیتر از محلول دارویی فلوکونازول را که در رقت های ۰/۵ تا ۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر تهیه کرده بودیم، در ۸ ردیف عمودی در چاهک‌ها ریختیم. سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول کلوییدی نانوقره را در رقت های پشت سر هم ۰/۲۵ تا ۳۲ میکروگرم در میلی لیتر در ۸ ردیف افقی به آن افزودیم. (به این ترتیب غلظت داروی مورد نظر ما در اولین ردیف عمودی، ۶۴ میکروگرم در میلی لیتر و در هشتمین ردیف عمودی ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر بود و غلظت محلول کلوییدی نانوسیلور در اولین ردیف افقی ۳۲ میکروگرم در میلی لیتر و در هشتمین ردیف افقی ۰/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر بود. به این ترتیب بیشترین غلظت دارو در اولین چاهک عمودی و افقی و کمترین غلظت دارو، در هشتمین چاهک عمودی و افقی بود. هم چنین $100 \mu\text{L}$ از هر دارو را در رقت های پشت سرهم به تنهایی در ۹ چاهک دیگر ریخته و در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون مخمری با تراکم 1×10^3 سلول بر میلی لیتر را به همه چاهک‌ها اضافه کردیم و به مدت ۳-۵ دقیقه روی شیکر (Shaker) قرار داده و میکروپلیت را داخل انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس گذاشته بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار دادیم. این فرآیند برای هر نمونه ۳ بار تکرار شد و میانگین

۳) تعیین حساسیت گونه های کاندیدا نسبت به نانودره نقره و فلوکونازول به تنهایی و همراه با یکدیگر.

کشت نمونه قارچی مورد آزمایش: گونه‌های کاندیدایی شناسایی شده در مرحله پیش روی محیط سابورو دکستروز آگار کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری گردید. پس از طی مدت انکوباسیون، از نمونه قارچی برای تهیه سوسپانسیون مخمری استفاده شد.

تهیه سوسپانسیون از سلول مخمری کاندیدا: برای تهیه سوسپانسیون کاندیدایی 1×10^3 سلول بر میلی لیتر، سلول مخمری ۲۴ ساعته بالا به کمک یک لوپ از سطح محیط کشت جمع آوری و در یک میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل معلق گردید. با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر و تغییر دادن تراکم سلولی، عبور نوری (Transmittance) ۹۰٪ را ایجاد نمودیم که معادل دربردارندگی 1×10^6 سلول در هر میلی لیتر بود. سپس آن را ۱۰۰۰ بار رقیق نمودیم و در عمل در یک لوله ۵cc سرم فیزیولوژی استریل ریخته، ۵ میکرولیتر از آن خارج کرده و $5 \mu\text{L}$ از سوسپانسیون مخمری 1×10^6 سلول را به آن افزودیم. سوسپانسیون به دست آمده حاوی 1×10^3 سلول در میلی لیتر بود (۱۴-۱۶).

تهیه رقت پشت سر هم نانوقره: ابتدا محلول کلوییدی نانوقره با غلظت PPM ۴۰۰۰ را که از شرکت نانو نصب پارس خریداری شده بود با آب مقطر استریل رقیق کرده تا رقت ۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر از این محلول به دست آید و سپس آن را با سابورو رقیق سازی کردیم تا یک رقت پشت سر هم از ۶۴ تا ۰/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر به دست آید.

تهیه رقت پشت سر هم فلوکونازول: ابتدا

جدول ۱: محدوده MIC, FIC دو دارو بر حسب میکروگرم در میلی لیتر

نوع دارو	MIC فلوکونازول	MIC نانوسیلور	تعداد گونه	نوع گونه
۰/۲۵-۱/۰۴	۴-۱۲۸	۱۶-۱۶۴	۱۹	آلبیکنس
۰/۵-۲/۰۶	۱۶-۶۴	۱۶-۱۶۴	۴	گلابراتا
۰/۰۳-۱/۰۶	۴-۱۲۸	۳۲-۶۴	۳	کروزوی
۲/۰۳	۳۲	۳۲	۲	تروپیکالیس
۱/۰۱	۶۴	۳۲	۱	پاراپسیلوزیس
۰/۳۷	۴	۱۶	۱	فاماتا

جدول ۲: مقایسه میانگین MIC در دو داروی فلوکونازول و نانوسیلور در زمان های ۲۴، ۴۸، و ۷۲ ساعت

نوع دارو	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
فلوکونازول	۶۱,۳۷±۵,۴۵	۸۰,۳۷±۵۲,۲	۸۷,۲۰±۵۰,۳۸
نانوسیلور	۲۹,۸۷±۱۱,۶۸	۲۹,۸۷±۱۱,۶۸	۳۷,۳۳±۱۵,۹۱
P-مقدار*	۰,۲۴۵	۰,۰۰۱	۰,۰۰۱

جدول ۳: توزیع فراوانی اثر هم افزایی در کاندیدا آلبیکنس و غیرآلبیکنس

اثر هم افزایی و هم افزایی نسبی دارد	اثر هم افزایی و هم افزایی نسبی ندارد	کل
آلبیکنس (۱۷) (۸۹,۵٪)	۲ (۱۰,۵٪)	۱۹ (۱۰۰٪)
غیرآلبیکنس (۶) (۵۴,۵٪)	۵ (۴۵,۵٪)	۱۱ (۱۰۰٪)
کل (۲۳) (۷۶,۷٪)	۷ (۲۳,۳٪)	۳۰ (۱۰۰٪)

مورد کاندیدا پاراپسیلوزیس (۳/۳٪) و یک مورد کاندیدا فاماتا (۳/۳٪) بودند. محدوده MIC نانوسیلور بر روی گونه‌های کاندیدا بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون بین ۱۶-۶۴ μg/mL بود (جدول ۱).

محدوده MIC فلوکونازول بر روی گونه‌های کاندیدا بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون بین ۴-۱۲۸ μg/mL بود (جدول ۱).

طبق جدول ۲، برای میانگین MIC در دو داروی فلوکونازول و نانوسیلور در زمان‌های مختلف از آزمون من-ویتنی استفاده شد که این

آن به عنوان MIC (Minimal Inhibitory Concentration) در نظر گرفته شد و سپس از آزمون من-ویتنی برای در زمان های مختلف استفاده کردیم. برای تعیین اثر هم افزایی دارو (Fractional Inhibitory Concentration) FIC آن را طبق فرمول ذیل به دست آوردیم و در نهایت، رگرسیون لجستیک برای تعیین اثر آن در گونه ها انجام شد (۱۴-۱۶).

$$FIC = \frac{MIC \text{ داروی اول در ترکیب}}{MIC \text{ داروی اول به تنهایی}} + \frac{MIC \text{ داروی دوم در ترکیب}}{MIC \text{ داروی دوم به تنهایی}}$$

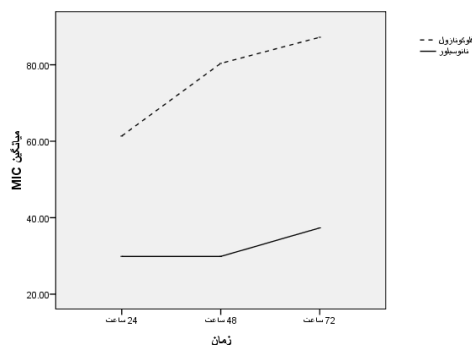
$$FIC \leq 0.5 = \text{سینرژیسم}, 0.5 < FIC < 1 = \text{سینرژیسم نسبی},$$

$$FIC = 1 = \text{اثر افزایشی}, 4 < FIC < 1 = \text{بی اثر}, FIC > 4 =$$

$$\text{آنتاگونیسم} (16).$$

یافته‌ها

پس از انجام آزمایش های تشخیصی ۳۰ مورد واژینیت مزمن مشخص شدند، که عوامل اتیولوژیکی آن به ترتیب فراوانی، شامل ۱۹ مورد کاندیدا آلبیکنس (۶۳/۳٪)، ۴ مورد کاندیدا گلابراتا (۱۳/۳٪)، ۳ مورد کاندیدا کروزوی (۱۰٪)، ۲ مورد کاندیدا تروپیکالیس (۶/۶٪)، یک



نمودار ۱: مقایسه میانگین MIC در دو دارو

مزمون معنی دار بود یعنی این دو دارو اثر متفاوتی با یکدیگر داشتند.

هم چنین طبق جدول ۳، در بررسی اثر هم افزایی و هم افزایی نسبی، اثر گونه در رگرسیون لجستیک، معنی دار بود یعنی احتمال داشتن اثر هم افزایی و هم افزایی نسبی در گونه آلبیکنس، ۹۵ درصد و در گونه های غیر آلبیکنس ۴۵ درصد می باشد.

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، گونه غالب جدا شده، کاندیدا آلبیکنس با فراوانی ۶۳/۳ درصد بود و کاندیدا پاراپسیلوزیس و کاندیدافاماتا با ۳/۳٪ کم ترین فراوانی را داشتند. هم چنین کاندیدا گلابراتا با فراوانی ۱۳/۳ درصد بیش ترین فراوانی را بعد از کاندیدا آلبیکنس داشت.

مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده است که عفونت های با اهمیت قارچی عمدتاً به وسیله گونه های مقاوم به داروهای ضد قارچی ایجاد می شوند (۱۷). این موضوع به ویژه در مورد گونه های کاندیدا در رابطه با تأثیر داروی ضد قارچی فلوکونازول مورد تأکید قرار گرفته است. بنابر دلایل فوق و ایجاد مقاومت دارویی، گرایش نسبت به یافتن ترکیبات ضد قارچی جدید افزایش یافته است (۱۷).

به این ترتیب افزایش فعالیت فلوکونازول در ترکیب با آنتی اکسیدان ها بر روی ارگانسیم های مقاوم به فلوکونازول مورد بررسی قرار گرفته و مشاهده شده که فلوکونازول به تنهایی هیچ فعالیتی بر روی ارگانسیم های مقاوم ندارد و آنتی اکسیدان ها فعالیت فلوکونازول را از طریق افزایش نفوذ پذیری غشای سلولی افزایش می دهند (۱۷).

در همین راستا، تحقیق حاضر با هدف بررسی تأثیر داروی ضد قارچی فلوکونازول به صورت جداگانه و همراه با نانوسیلور بر روی مخمرهای بیماری زا شامل گونه های مختلف کاندیدا انجام شد. در این مطالعه، (جدول ۱) مشخص گردید که فلوکونازول اثر چندانی بر روی گونه های کاندیدیایی جدا شده از واژینیت کاندیدیایی

مزمون ندارد و فقط در غلظت های بالا قادر به مهار نسبی یا کامل رشد عوامل مخمری می باشد. محدوده MIC این دارو بر روی گونه های کاندیدا بین ۴-۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر می باشد. هم چنین بین گونه های کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران، فقط ۵/۲۶ درصد از آن ها، به فلوکونازول حساس بودند در مطالعه دیگری نیز ۷/۱۴ درصد از کاندیدا آلبیکنس جدا شده از بیماران، به فلوکونازول حساس بودند که این نتایج با یکدیگر هم خوانی دارد (۱۸). در این تحقیق مشخص گردید که دامنه MIC نانوسیلور برای گونه های کاندیدا بین ۱۶-۶۴ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد. در مطالعه ای دیگر MIC نانوذرات نقره روی گونه های کاندیدا بین ۱-۲۵ میکروگرم در میلی لیتر بود که احتمالاً این اختلاف مربوط به نوع سوش استاندارد می باشد که استفاده شده است (۱۰). سرانجام پس از بررسی های لازم مشخص گردید که MIC فلوکونازول (طبق جدول ۲) در برابر گونه های کاندیدا آلبیکنس، در ۷۲ ساعت بیشتر از زمان های ۲۴ و ۴۸ می باشد. میانگین MIC نانوسیلور نیز همین طور و طبق آزمون من-ویتنی اختلاف دو دارو با یکدیگر معنی دار می باشد. هم چنین بر اساس جدول ۳، طی آزمون انجام شده مشخص شد که اثر گونه در بررسی اثر هم افزایی و هم افزایی نسبی معنی دار می باشد، یعنی احتمال داشتن اثر هم افزایی و هم افزایی نسبی در گونه کاندیدا آلبیکنس ۹۵ درصد و در گونه غیر آلبیکنس ۴۵ درصد است. هم چنین در مطالعات دیگر، محققان نشان داده اند که ترکیب فلوکونازول با نانوسیلور تولید شده از خود قارچ ها بر روی سوش استاندارد کاندیدا آلبیکنس موثر بوده است که با مطالعه ما هم خوانی دارد (۱۹). بنابراین، بر اساس اثر هم افزایی دیده شده در تداخل نانوسیلور با فلوکونازول، این آزمایش در مدل های حیوانی کاندیدیازیس نیز باید جستجو گردد.

بهره گیری از آزمایشگاه برای تشخیص صحیح عفونت، تعیین حساسیت در آزمایشگاه و تجویز نانوسیلور همراه با فلوکونازول در

مزمون معنی دار بود یعنی این دو دارو اثر متفاوتی با یکدیگر داشتند.

هم چنین طبق جدول ۳، در بررسی اثر هم افزایی و هم افزایی نسبی، اثر گونه در رگرسیون لجستیک، معنی دار بود یعنی احتمال داشتن اثر هم افزایی و هم افزایی نسبی در گونه آلبیکنس، ۹۵ درصد و در گونه های غیر آلبیکنس ۴۵ درصد می باشد.

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، گونه غالب جدا شده، کاندیدا آلبیکنس با فراوانی ۶۳/۳ درصد بود و کاندیدا پاراپسیلوزیس و کاندیدافاماتا با ۳/۳٪ کم ترین فراوانی را داشتند. هم چنین کاندیدا گلابراتا با فراوانی ۱۳/۳ درصد بیش ترین فراوانی را بعد از کاندیدا آلبیکنس داشت.

مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده است که عفونت های با اهمیت قارچی عمدتاً به وسیله گونه های مقاوم به داروهای ضد قارچی ایجاد می شوند (۱۷). این موضوع به ویژه در مورد گونه های کاندیدا در رابطه با تأثیر داروی ضد قارچی فلوکونازول مورد تأکید قرار گرفته است. بنابر دلایل فوق و ایجاد مقاومت دارویی، گرایش نسبت به یافتن ترکیبات ضد قارچی جدید افزایش یافته است (۱۷).

به این ترتیب افزایش فعالیت فلوکونازول در ترکیب با آنتی اکسیدان ها بر روی ارگانسیم های مقاوم به فلوکونازول مورد بررسی قرار گرفته و مشاهده شده که فلوکونازول به تنهایی هیچ فعالیتی بر روی ارگانسیم های مقاوم ندارد و آنتی اکسیدان ها فعالیت فلوکونازول را از طریق افزایش نفوذ پذیری غشای سلولی افزایش می دهند (۱۷).

در همین راستا، تحقیق حاضر با هدف بررسی تأثیر داروی ضد قارچی فلوکونازول به صورت جداگانه و همراه با نانوسیلور بر روی مخمرهای بیماری زا شامل گونه های مختلف کاندیدا انجام شد. در این مطالعه، (جدول ۱) مشخص گردید که فلوکونازول اثر چندانی بر روی گونه های کاندیدیایی جدا شده از واژینیت کاندیدیایی

10. Keuk- Jun. K, Song sung W. Anti fungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *Journal microbiological and biotechnological Korea*. 2008; 18: 1482- 1484.

11. Jackson C, Agboke A. In vitro evaluation of antimicrobial activity of combination of nystatin and Euphorbia hirta leaf extract against candida albicans by the checker board method. *Journal of Medical plants research*. 2009; 3: 666-669.

12. Gemenia C, Veditti M. Fluconazole in combination with flucytosine in the treatment of fluconazole- resistant candida infections, *diagnostic microbiology and infections Disease*. 2003; 227-231.

13. Razzaghparsat A, Shams Ghahfarokhi M. barrasie asarate zede gharchie piaz va barkhi az daroohaye azoli be soorate monfared va dar tarkib ba yekdigar bar rooye mokhammerhaye bimariza. *Kosar medical journal*. 1387;2: 103-113. [Persian]

14. Warnock WD, Evans EGN, FGN, Richardson MD. *Method with antifungal drugs, Medical mycology apractical approach*^{1st}. New York: Oxford university press; 1989: P: 35-259.

15. John H R, David A. Reference method for broth dillution antifungal susceptibility testing of yeast fungi. Approved standard second edition (formerly NCCLS m27A2), Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, USA. 16, 2008.

16. Khodavandi A, Alizadeh F. Invitro Investigation of antifungal activity of allicin Alone and in Combination with Azoles Against candida Species. *Mycopathologia*. 2010;169:287-295.

17. Shams Ghahfarokhi M, Razzaghparsat A. Tasire darooye zede gharchie fluconazole, itraconazole va ketokonazole be soorate monfared va makhloot ba yekdigar bar rooye mokhammerhaye bimarizay. Gonabad University of Medical Sciences. 1386,44: 21-28[persian].

18. Falahati M, Sharifinia S, Olgooye moghavemate darooye dar goonehaye candidiae joda shode az vaginit nesbat be daroohaye motedavel va chand darooye santeticejadedMajalle Oloompezeshkie Iran. 1386-87[Persian].

19. Gajbhiye M, Kesharvani J. fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. department of biotechnology Amravati university Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, Medicine. 2009;5: 382-386.

فرمولاسیون‌های داروهای موضعی برای درمان کاندیدیازیس مزمن واژینال ممکن است مفید باشد. در این مطالعه درجه خلوص با منابع مختلفی که آن دارو فراهم می شود تفاوت دارد و این می تواند باعث ایجاد تغییر در یافته‌ها گردد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه خانم شیما نوذری در مقطع کارشناسی ارشد به راهنمایی دکترمهربان فلاحتی و مشاوره دکتر فریده حیدری که در سال ۱۳۹۰ و کد ۱۰۶۴۴ می باشد که با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی تهران اجرا شده است. نویسندگان این مقاله از همکاری معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران و زحمات کارکنان این معاونت نهایت تشکر را دارند.

منابع

1. Ferrer J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. *international Journal of gynecology and obstetrics*. 2000; 71: 21-27.

2. Owen MK. Clenney management of vaginitis. *Am Fam physician J*. 2004;70: 1-10.

3. Mardh PA, Wagsttom J, land G renm. Usage of Antifungal drags for theraphy of genital candida infection Parthenon publishing. A Member of the taylor and Francis Group. 2004;12: 91-97.

4. Zaini F, Mehbod A, Emami M Gharch shenasie pezeshkie jamee. Tehran university publications. 1388;3: 339.

5. Kinghorn GR. Valvovaginal candidiasis, J *Anti micro chemotherapy*. 1991;28: 59-66.

6. Maznei kova V. Vaginal candidiasis treatment protocols using miconazole and fluconazde. *Akush ginekol (sofila)*. 2003;42: 30-40.

7. Medling W, Kruass C, Fladung B. Comparing efficacy and tolonability of typical combination therapy with clotrimazole and single dose fluconazole in vulvovaginal my cases. *Mycoses*. 2004; 47: 136-42.

8. Chen X, Sch luesener H.J. Nano silver: A nano a product in medical application. *Toxicology letters*. 2008; 176: 1-12.

9. Choloupla K, Malam Y. Nanosilver as a new generation of nano products in biomedical application. *Trends in biotechnology*. 2010;11: 580-588.

Comparison of antifungal effect of fluconazole alone and in combination with nanosilver particles against candida species isolated from chronic candidal vulvovaginitis

Shima Nozari, MSc student of Mycology, Medicine Faculty, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. shimanozari@yahoo.com.

Fariba Haydari kohan, MD. Assistant professor of gynecology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. dr_heidarie@yahoo.com .

Mahtab Ashrafi khozani, MSc. Mycologist, Medicine Faculty, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. asm2345@yahoo.com:

Farzaneh Ahmadi, MSc Student of statistics, Paramedicine Faculty ,Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ahmadi.farzan@gmail.com.

Zeinab Ghasemi, MSc student of Mycology, Medicine Faculty, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. zeinabghasemi@yahoo.com.

Sanam Nami, MSc. Mycologist, Medicine Faculty, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. sanamnami@yahoo.com.

***Mehraban Falahati, PhD**. Associate Professor of Mycology, Medicine Faculty, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. (*Corresponding author). mehrabanfalahati@yahoo.com

Abstract

Background: Candidal vulvovaginitis is a female genital infection that is occurred by the over growth of candida species and specially *Candida albicans* and occasionally it appears as recurrent and chronic and resist to therapy. Fluconazole is one of the current drugs that is used in treatment of this disease and sometimes resistance is observed to this. Therefore indirection of making the therapy better we decided to investigate the activity of fluconazole in combination with silver nanoparticles against candida species isolated from chronic and recurrent candidal vaginitis.

Methods: This was an experimental study with convenient sampling that was performed on 30 patients. All specimens were examined in direct microscopy, culturing and differential tests to identify different candida species from each other such as culture on candida chrom agar, germ tube, temperature test and sugar assimilation with API. Then the antifungal effects of fluconazole and silver nanoparticles, each of them alone and in combination with each other, were examined. Findings were described on the base of logistic regression and man-vitni exam.

Results: In our study 30 specimens of chronic genital candidiasis were diagnosed with isolated agents *Candida albicans*, *glabrata*, *krusei*, *tropicalis*, *parapsilosis* and *Candida famata* respectively. Also findings suggested that fluconazole was able to inhibit the growth of candida species at an expanded range of concentration between 4-128 microgeram per milliliter. As well antifungal activity of Fluconazole with silver nanoparticles was increased in comparison with using Fluconazole alone.

Conclusion: For the prevention of recurrent cases and to stabilish correct diagnosis it is essential to carry out sensitivity and diagnostic tests in laboratory and also administration of silver nanoparticle in combination with fluconazole in drug formulation for topical uses in treatment of chronic vaginal candidiasis and inhibition of recurrent cases, can useful.

Keywords: Fluconazole, Nanosilver, Antifungal susceptibilty, Synergism, Candida species.