

بررسی اثر دو اسانس گیاهی اکالیپتوس و لاواندا بر رشد سویه های حیوانی کاندید آلبیکنس مقاوم و حساس به ایتراکونازول

لیلا فزونی^{۱*}، منصور بیات^۲، شهلا رودبار محمدی^۳، محمد حسن شاه حسینی^۴

۱. دانشجوی دکتری تخصصی، گروه فارچ شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

۲. دانشیار گروه فارچ شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

۳. استادیار گروه فارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴. دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۲۱ مرداد ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۲ خرداد ۱۳۹۲

چکیده

کاندید یازیس نوعی بیماری قارچی است که شایع ترین و مهم ترین عامل ایجاد آن در دام و انسان، مخمر کاندیدا آلبیکنس می باشد. با توجه به افزایش مقاومت قارچ ها نسبت به داروهای ضد قارچی و وجود محدودیت های درمانی بیماری های قارچی نظیر گرانی و عوارض جانبی حاصل از آنها، بررسی ترکیبات جایگزین از جمله گیاهان داروئی ضرورت دارد. هدف از این تحقیق، بررسی اثر دو اسانس گیاهی اکالیپتوس و لاواندا (اسطوخودوس) بر رشد سویه های بالینی کاندیدا آلبیکنس جدا شده از دام های مبتلا به عفونت های مخاطی و جلدی و مقایسه آنها با کاندیدا آلبیکنس های مقاوم و حساس به ایتراکونازول می باشد. این مطالعه بر روی ۲۰ سویه کاندیدا آلبیکنس به دست آمده از دام های (گاو و سگ) مبتلا به کاندید یازیس جلدی و مخاطی صورت گرفت. جهت تعیین حساسیت نمونه ها به اسانس های اکالیپتوس و لاواندا از روش میکرو دایلوژن برآستفاده شد. در این روش ابتدا اسانس ها دردی متیل سولفوکساید حل شدند و به نسبت ۱:۱۰۰ با محیط کشت RPMI رقیق شدند و رقت های سریالی از آنها در میکرو پلیت تهیه شد پس از تلقیح نمونه های مخمری و طی زمان آنکوباسیون و مقایسه آنها با چاهک کنترل MIC_s تعیین شد. در این مطالعه MIC اکالیپتوس بر ضد کاندیدا آلبیکنس در دامنه ۱۰۲۴-۴ $\mu\text{l/ml}$ تعیین شد که بیشترین تغییرات در غلظت های ۶۴ و ۳۲ از نظر میزان رشد دیده شد همچنین MIC لاواندا در دامنه ۱-۲۵۶ $\mu\text{l/ml}$ تعیین شد به طوری که بیشترین تغییرات رشد در غلظت های ۱۶ و ۸ دیده شد. نتایج نشان داد که اسانس های اکالیپتوس و لاواندا اثر ضد قارچی بسیار خوبی بر علیه کاندیدا آلبیکنس دارند. در این بررسی هر دو اسانس لاواندا و اکالیپتوس اثر ضد کاندیدائی خوبی نشان دادند و تفاوت معنی داری بین سویه های حساس و مقاوم به ایتراکونازول در میزان MIC آنها دیده نشد.

کلمات کلیدی: کاندیدا آلبیکنس، اکالیپتوس، لاواندا، اسانس، دام، MIC

* نویسنده مسئول: لیلا فزونی

آدرس: گروه فارچ شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران. تلفن: ۲۲۱۴۹۹۰-۰۱۵۱

پست الکترونیک: lili_kia@yahoo.com

مقدمه

کاندیدیازیس از جمله شایع ترین بیماری قارچی در حیوانات خونگرم و انسان است که در سال های اخیر گسترش چشمگیری داشته است. عامل بیماری قارچی فرصت طلب از جنس *کاندیدا* می باشد که به صورت همزیست در دستگاه گوارش، مخاطات و پوست حیوانات و انسان وجود دارد. این عامل در شرایطی که مقاومت میزبان به صورت موضعی یا سیستمیک به صورت اولیه و یا ثانویه در اثر عوامل مستعد کننده بیماری کاهش یابد قادر به ایجاد بیماری در هر ناحیه از بدن خواهد بود (۷). این قارچ بسته به طبیعت میزبان، دو گروه عفونت را به وجود می آورد: عفونت های سطحی (مانند: دهانی، مهبلی و کاندیدیازیس جلدی) که در میزبان سالم هم دیده می شود، عفونت های عمقی (مانند: ریوی، گوارشی، ادراری و کاندیدی) که در میزبان با اختلال شدید ایمنی رخ می دهد (۵).

در سگ ها، ضعف سیستم ایمنی، استفاده از رژیم های غذایی پر نشاسته، مشکلات تیروئیدی و استفاده از آنتی بیوتیک های وسیع الطیف به بیماریزایی *کاندیدا* کمک می کند که بیشتر به فرم راش های پوستی و واژنیت در سگ های ماده ظاهر می شود (۱۱ و ۱۳). در گاو ها، کاندیدیازیس معمولاً به شکل پوستی-مخاطی، تظاهر می یابد. در گوساله ها کاندیدیازیس دور لب و سطح زبان بیشتر دیده شده است. در صورتی که در گاو های بالغ از تنوع بیشتری برخوردار است به طوری که علاوه بر کاندیدیازیس دهانی، اشکال گوارشی، واژنیت، ورم پستان و سقط جنین نیز دیده می شود رژیم های غذایی غنی از هیدروکربن، مصرف آنتی بیوتیک های قوی در امراض باکتریائی و بیماری های متابولیکی از زمینه های مستعد کننده کاندیدیازیس در گاو ها به شمار می آیند (۲، ۱۴، ۲۴).

امروزه در درمان این عفونت ها، از داروهای مختلف از جمله گروه آزول نظیر ایتراکونازول استفاده می شود اما بررسی های مختلف، مقاومت گونه های *کاندیدا* را نسبت به داروهای ضدقارچی نشان می دهد (۷ و ۲۱). همچنین برخی از عوامل ضدقارچی برای سلول های بدن میزبان سمیت دارند که این امر یک معضل اساسی در درمان چنین بیماری هایی ایجاد کرده است. شایان ذکر است که استفاده از داروهای گیاهی در درمان بیماری ها از گذشته دور در کشور ما متداول بوده و دارای سابقه چند هزار ساله است (۲۵). اکالیپتوس درختی از تیره موردی ها می باشد که اصلش از استرالیا است ولی به نقاط مختلف عالم انتشار یافته است. نام علمی جنس آن از دو واژه یونانی *eu* به معنای خوب و *kalypso* به معنای پنهان مشتق شده است. این درخت در حدود بیش از نیم قرن قبل به ایران وارد شده است. گونه های اکالیپتوس بیشتر در آب و هوای نیمه خشک و نیمه مرطوب رشد می نمایند. اسانس اکالیپتوس از ماده موثره سینئول (۸۵-۷۰٪) تشکیل شده است. علاوه بر این ماده، منوترین ها (مثل لینالول، بورنشول) و همچنین سزکی ترین ها (مانند کاریوفیلین) نیز در آن موجود است (۱۰، ۱۸، ۲۵ و ۲۸). لاواندا یا اسطوخودوس در بیشتر نقاط دنیا به حالت خودرو می روید. گیاهی چندین ساله با برگ های باریک و دراز و سبز رنگ است. اسانس آن که از تقطیر گل و سرشاخه های گل در این گیاه به دست می آید، مایعی است زرد رنگ یا زرد مایل به سبز که دارای بوی مطبوعی است. اسانس آن دارای حدود ۴۰٪ استات لینالیل است. همچنین در آن ترکیباتی نظیر اسید بوتیریک، اسید پروپیونیک، اسید والریک، لینالول آزاد و ژرامبول وجود دارد. این گیاه به اسامی دیگری چون ناردین نیز نامیده می شود (۴).

ایتراکونازول گزارش شدند در بین سویه‌های مقاوم ۵ نمونه از گاو و ۲ نمونه از سگ و در بین سویه‌های حساس ۷ نمونه از گاو و ۶ نمونه از سگ‌های مبتلا به کاندیدیازیس جدا شده بود.

به منظور تعیین حساسیت سویه‌های *کاندیدا آلبیکنس* نسبت به اسانس‌های اکالیپتوس و لاواندا ابتدا سوسپانسیونی از کشت‌های ۴۸ ساعته سویه‌های *کاندیدا آلبیکنس* رشد یافته در محیط سابورو دکستروز آگار با آب مقطر تهیه نموده و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر و انتقال نور ۷۷-۷۵ درصد، نمونه اولیه که حاوی 10^6 مخمر به ازای هر سی سی از آب مقطر باشد را آماده نموده سپس نمونه را ابتدا به نسبت $1/10$ با آب مقطر و نهایتاً به نسبت $1/100$ با محیط کشت *RPMI ۱۶۴۰* (با گلوتامین، بدون بی کربنات با شناساگر *PH*، شرکت سیگما) و بافر *mops* (شرکت سیگما) رقیق می‌کنیم تا تعداد نهایی مخمرهای ما به $10^3 cfu/ml$ برسد. دو اسانس اکالیپتوس و لاواندا از شرکت داروسازی باریج اسانس تهیه شد. به منظور ساخت استوک از اسانس‌ها، از حلال دی متیل سولفو کساید (*DMSO*) استفاده شد لذا $1/0.24$ میلی لیتر از اسانس اکالیپتوس در ۴ میلی لیتر حلال *DMSO*، 0.3 میلی لیتر از اسانس لاواندا در $4/7$ میلی لیتر *DMSO* حل گردید تا به حجم نهایی ۵ میلی لیتر برسد. تمامی استوک‌ها به نسبت $1/100$ با محیط *RPMI* رقیق شدند.

در ادامه 0.1 میلی لیتر از هر استوک با $9/9$ میلی لیتر محیط کشت *RPMI* در داخل لوله مخلوط شدند و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک‌های میکروپلیت که حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت *RPMI* می‌باشند تلقیح شدند و به صورت سریالی رقیق سازی گردیدند سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمری تهیه شده

در حال حاضر استفاده از داروهای گیاهی در درمان یک سری از بیماری‌های عفونی، افقی را پیش روی ما گشوده است و هم‌اکنون تحقیقات گسترده‌ای در جهان بر روی گیاهان دارویی در حال انجام می‌باشند که بر همین اساس تحقیق حاضر انجام شده است.

هدف از این بررسی تعیین *MIC* (حداقل غلظت مهار) اسانس‌های اکالیپتوس و لاواندا بر ممانعت از رشد *کاندیدا آلبیکنس*‌های جدا شده از دام‌های مبتلا به کاندیدیازیس مخاطی و جلدی است. همچنین انواع سویه‌های *کاندیدا آلبیکنس*‌های مقاوم و حساس به ایتراکونازول از نظر حساسیت به اسانس‌های مذکور مقایسه شدند و اینکه آیا سویه‌های مقاوم به ایتراکونازول به این دو اسانس نیز مقاومت نشان می‌دهند یا خیر، مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی ۲۰ ایزوله *کاندیدا آلبیکنس* شامل ۸ ایزوله حاصل از عفونت‌های مهلبی و پوست در سگ و ۱۲ ایزوله به دست آمده از عفونت‌های مهلبی و پستانی در گاو مورد بررسی قرار گرفتند این سویه‌ها جهت شناسایی و تایید گونه *آلبیکنس* با استفاده از آزمایش مستقیم، کشت بر روی کورن میل آگار توئین ۸۰، تست لوله زایا، رنگ کلنی بر روی کروم آگار، تست جذب قندها توسط کیت *API۱۲۰* بررسی شدند در این تحقیق به عنوان سویه استاندارد از *کاندیدا آلبیکنس* (*ATCC9۰۰۲۹*) استفاده شد. جهت تعیین حساسیت یا مقاومت به داروی ضدقارچی ایتراکونازول از روش میکروداپلوشن برات استفاده شد طبق دستورالعمل پیشنهادی *CLSI*، سویه‌های با $\mu l/ml$ $MIC \leq 0.125$ حساس و با $1 \mu l/ml$ $MIC \geq 1$ مقاوم به ایتراکونازول تلقی می‌شوند (۱۷). در این بررسی ۱۳ سویه حساس به ایتراکونازول و ۷ سویه مقاوم به

میانگین MIC اکالیپتوس بر ضد سویه استاندارد کاندیدا آلیکنس $128 \mu l/ml$ تعیین شد میانگین MIC اکالیپتوس بر ضد کاندیدا آلیکنس های مقاوم به دارو ۱۲۸ و برای کاندیدا آلیکنس های حساس به دارو ۳۲ گزارش شد که نشان می دهد در بین سویه های حساس و مقاوم به ایتراکونازول تفاوت معنی داری وجود ندارد (جدول ۳).

میانگین MIC لاواندا بر علیه کاندیدا آلیکنس ۱۶ (از ۱ تا ۲۵۶) گزارش شد که بیشترین تغییرات از نظر میزان رشد در رقت های ۸ و ۱۶ مشاهده گردید (جدول ۲) و تمامی سویه ها در رقت ۶۴ و بالاتر رشدی نشان ندادند. در سایر رقت ها بدون هیچ تغییری رشد مشاهده شد.

میانگین MIC لاواندا بر علیه سویه استاندارد کاندیدا آلیکنس $16 \mu l/ml$ تعیین شد. در بین سویه های بالینی، سویه های مخاطی و جلدی بیشترین حساسیت را در غلظت $8 \mu l/ml$ نشان دادند. میانگین MIC لاواندا برای سویه های حساس به ایتراکونازول ۸ و برای سویه مقاوم به ایتراکونازول ۳۲ تعیین شد که تفاوت معنی داری را بین سویه های حساس و مقاوم به دارو نشان نمی دهد (جدول ۳).

با غلظت $10^3 cfu/ml$ به هر یک از چاهک ها تلقیح گردید. به عنوان شاهد مثبت در یک چاهک از مخلوط $RPMI$ و مخمر، و به عنوان شاهد منفی از مخلوط $RPMI$ و اسانس استفاده شد. جهت بررسی اثرات ضد کاندیدیایی اسانس اکالیپتوس از غلظت های ۱۰۲۴-۴ و در مورد لاواندا از غلظت های $1-256 \mu l/ml$ استفاده شد. پس از بستن درب میکروپلیت ها، آنها به مدت ۴۸ ساعت در ۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از طی زمان انکوباسیون از نظر رشد یا عدم رشد بررسی شدند. در صورت عدم رشد در چاهک های کنترل و اطمینان از سلامت پروسه با استفاده از آینه مخصوص چاهک ها بررسی شدند.

نتایج

در این بررسی میانگین MIC اکالیپتوس بر ضد کاندیدا آلیکنس در مجموع $50 \mu l/ml$ تعیین شده است که در رقت های ۶۴ و ۳۲ بیشترین تغییرات از نظر رشد مشاهده شد (جدول ۱) و در رقت ۲۵۶ و بالاتر در تمامی ارگانیس م ها عدم رشد مشاهده شد. در بقیه رقت ها رشد مشاهده و هیچ گونه تغییری مشاهده نشد.

جدول ۱: مقایسه رشد یا عدم رشد سویه های کاندیدا آلیکنس در غلظت های $64 \mu l/ml$ و 32 اسانس اکالیپتوس

مقایسه	رشد		عدم رشد		سویه cfu/ml	اسانس / رقت $\mu l/ml$
	درصد	تعداد	درصد	تعداد		
$\chi^2=0$ NS	۸۵	۱۷	۱۵	۳	کاندیدا آلیکنس	۶۴
$\chi^2=0$ NS	۹۵	۱۹	۵	۱	کاندیدا آلیکنس	۳۲

NS: Not Significant

جدول ۲: مقایسه رشد یا عدم رشد سویه های کاندیدا آلیکنس در غلظت های $16 \mu l/ml$ و 8 اسانس لاواندا

مقایسه	رشد		عدم رشد		سویه cfu/ml	اسانس رقت $\mu l/ml$
	درصد	تعداد	درصد	تعداد		
$\chi^2=0$ NS	۷۵	۱۵	۲۵	۵	کاندیدا آلیکنس	۱۶
$\chi^2=0$ NS	۹۰	۱۸	۱۰	۲	کاندیدا آلیکنس	۸

NS: Not Significant

جدول ۳: توزیع کمی حداقل غلظت مهاري اسانس‌های گیاهی تحت بررسی بر حسب حساسیت به ایتراکونازول

مقایسه	انحراف معیار	میانگین (μl/ml)	کاندیدا آلیکنس حساس یا مقاوم به ایتراکونازول	MIC اسانس
NS	۱۸	۱۲۸	مقاوم	اکالیپتوس
NS	۱۵.۲	۳۲	حساس	
NS	۱۱	۳۲	مقاوم	لاواندا
NS	۹.۱	۸	حساس	

NS: Not Significant

بحث و نتیجه‌گیری

داروهای آزول داروهایی هستند که با اختلال در سنتز ارگوسترول قارچی باعث نابودی قارچ ها می‌شوند. این داروها به دلیل طیف وسیعی که دارند از داروهای پرمصرف در موارد بالینی درمان عفونت‌های قارچی هستند (۱۲ و ۳۰). مکانیسم عمل این داروها به نحوی است که در روی بدن میزبان اثرات جانبی و عوارض مهمی بر جای می‌گذارند.

مطالعات سال‌های ۱۹۹۸ به بعد نشان می‌دهد که میزان مقاومت دارویی در بین کاندیدا آلیکنس‌های عامل ایجاد عفونت‌های انسانی و حیوانی به خصوص مقاومت به داروهای آزولی رو به افزایش است (۲۱). این مشکل خصوصا در درمان عفونت‌های کاندیدایی با ایتراکونازول، فلوکونازول و کلوتریمازول بسیار مشهود است. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده است که عفونت‌های با اهمیت قارچی در دام‌ها عمدتاً به وسیله گونه‌های مقاوم به داروهای ضدقارچی ایجاد می‌شود. این موضوع به ویژه در مورد گونه‌های کاندیدا در رابطه با تاثیر داروی ضدقارچی ایتراکونازول مورد تاکید قرار گرفته است (۲۳).

در مطالعه‌ای که Aimer در سال ۲۰۰۸ انجام داد، ۱۶ درصد گاوهای مبتلا به ورم پستان به ایتراکونازول مقاومت نشان داده بودند (۲). در بررسی حاضر با مطالعه بر روی ۲۰ سویه کاندیدا آلیکنس جدا شده از

گاوها و سگ‌های مبتلا به کاندیدازیس ۳۵ درصد جدایه‌ها با میانگین MIC برابر با ۲ به ایتراکونازول مقاومت نشان دادند که حاکی از افزایش مقاومت به این دسته از داروهاست.

بنا بر دلایل فوق، گرایش نسبت به یافتن ترکیبات ضدقارچی جدید و یا ترکیباتی که جایگزین مناسبی برای داروها باشند افزایش یافته است. لذا شایسته است تا با صرف وقت و هزینه مناسب به بررسی بیشتر روی چنین گیاهانی پرداخته تا بتوانیم به کشف مواد موثره و موفقیت‌های درمانی بیشتری نائل شویم.

درخت اکالیپتوس که با نام علمی اش نامیده می‌شود، از حدود نیم قرن پیش وارد ایران شده و ابتدا در جنوب و سپس در شمال کشورمان کشت شده است. به طوری که در حال حاضر درختان کهنسال آن در فارس دیده می‌شوند. قسمت‌های مورد استفاده اکالیپتوس برگ‌های آن بویژه برگ درختان مسن تر است. برگ‌های این گیاه دارای اسانس و روغن‌های با خواص ضد میکروبی می‌باشند (۲۰). در این بررسی MIC اسانس اکالیپتوس در دامنه ۴-۱۰۲۴ میکرولیتر بر میلی لیتر ارزیابی شد و مشخص شد تمامی سویه‌های کاندیدا آلیکنس مقاوم به ایتراکونازول در رقت‌های بالاتر از ۲۵۶ رشدی نشان ندادند.

Takahashi و همکاران در سال ۲۰۰۴ خواص ضد میکروبی اکالیپتوس را بررسی نمودند. در آن

انسانی کانیدیدا آلیکنس اثر قارچ کشی بالایی دارد (۳) و (۱۶).

فعالیت ضدقارچی اسانس و روغن‌های ضروری موجود در لاواند بر علیه کانیدیدا آلیکنس توسط Pinto و همکاران بررسی گردید. آنها اثر بخش ترین ترکیب موجود در این گیاه را لینالول معرفی کردند (۱۹).

نتایج بررسی حاضر بیانگر اثرات ضدکانیدیدی اسانس لاواند است. همچنین با توجه به نتایج حاصل از مقایسه MIC سویه‌های حساس و مقاوم به ایتراکونازول می‌توانیم از لاواند در درمان عفونت‌های کانیدیدی به ویژه موارد مقاوم به درمان بهره جوییم.

با تایید اثرات ضدکانیدیدی اسانس‌های بررسی شده و عدم وجود مقاومت در برابر این ترکیبات و افزایش روند مقاومت دارویی در بین کانیدیدها و با توجه به شرایط اقلیمی کشورمان که در پرورش چنین گیاهان دارویی بسیار مطلوب است، استفاده از چنین گیاهانی منطقی به نظر می‌رسد. لذا توصیه می‌شود اثر این اسانس‌ها بر سایر قارچ‌ها و همچنین باکتری‌های بیماری‌زای انسانی و حیوانی بررسی شود و با بررسی‌های بیشتر بر روی این گیاهان و خالص سازی و بهبود روش‌های استخراج آنها بتوانیم در آینده به نتایج خوبی دست یابیم. همچنین استفاده ترکیبی از دو یا چند اسانس جهت درمان قطعی و جلوگیری از عود عفونت‌ها ارزیابی شود تا نه تنها شاهد پیشرفت‌های درمانی باشیم، بلکه در زمینه داروسازی و دامپزشکی به خودکفائی بیشتری نائل شویم.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از جناب آقای دکتر سیامک مهدی رفیعی به خاطر همکاری در تهیه سویه‌های دامی (دام کوچک) کانیدیدا آلیکنس تقدیر و تشکر می‌گردد.

بررسی مشخص شد که سه ترکیب موجود در عصاره اکالیپتوس دارای خواص ضدقارچی موثری در درمان عفونت‌های پوستی کانیدیدی می‌باشند (۲۸).

در مطالعه ای که Kottearachchi و همکارانش در سال ۲۰۱۲ انجام دادند مشخص شد که ترکیبات موجود در روغن اکالیپتوس دارای خاصیت قارچ کشی برای قارچ‌های سم زای غلات مانند فوزاریوم می‌باشند (۱۵). در مطالعه به عمل آمده توسط بکائیان نشان داده شد که اسانس اکالیپتوس گلوبولوس دارای اثرات ضدکانیدیدی خوبی در موش‌های دیابتیک مبتلا به کانیدید یازیس می‌باشد (۶).

در این بررسی میانگین MIC اکالیپتوس بر ضدکانیدیدا آلیکنس‌های مقاوم به دارو ۱۲۸ و برای کانیدیدا آلیکنس‌های حساس به دارو ۳۲ گزارش شد. که در بین سویه‌های مقاوم و حساس به ایتراکونازول اختلاف معنی داری مشاهده نشد. لذا می‌تواند با تعیین مقدار عددی MIC اسانس جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی باشد.

اسطوخودوس یا لاواندا از گیاهان تیره نعناعیان می‌باشد که در اکثر نقاط دنیا از جمله ایران به خوبی قابل کشت است. اکثر مردم ما با این گیاه آشنا بوده و به میزان زیادی در طب سنتی و گیاه درمانی مصرف می‌شود که معرف آن ابوعلی سینا حکیم مشهور ایرانی بوده است.

در این بررسی MIC لاواندا در دامنه ۲۵۶-۱ میکرولیتر بر میلی لیتر تعیین شد و تمامی سویه‌های مقاوم به ایتراکونازول در رقت‌های بیشتر از ۶۴ رشدی نشان ندادند.

مطالعاتی جداگانه در سال‌های ۲۰۰۵ و ۲۰۱۱ نشان داد که روغن‌های ضروری و ترکیبات اسانسی موجود در لاواندا بر فرم مخمیری و جرم تیوب جدایه‌های

- Antioxidant activity of Egyptian *Eucalyptus camaldulensis* var. *brevirostris* leaf extracts. *Nahrung* **47**: 41-50.
10. Gilles, M., Zhao, J., An, M., Agboola, S. (2010). Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. *Food Chemistry* **119**: 731-7.
11. Greene, C.E, Chandler, F.W. (1998). Candidiasis, torulopsosis, and rhodotorulosis in infectious diseases of the dog and cat. **4**: 414-7.
12. Haria, M., Bryson, H.M., Goa, K.L. (2005). Itraconazole, a reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic use in the management of superficial fungal infections. *Drugs* **12**: 311-22.
13. Hesetine, J.C, Panciera, D., Saunders, G.K. (2003). Systemic candidiasis in a dog. *Journal of American Veterinary Medicine Association* **322**: 821-4.
14. Hldara, S.J. (2003). Bovine mycotic placentitis in New York State. *Cornell University College of Veterinary Medicine* **71**: 151-63.
15. Kottarachchi, N.S., Sammani, A., Kelaniyangoda, D.B., Samarasekara, R. (2012). Anti-fungal activity of essential oils of Ceylon *Eucalyptus* species for the control of *Fusarium solani* and *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology and Plant Protection* **45**: 2026-35.
16. Millak, J., Costa-de-Oliveira, S., Cavaleiro, C., Palmeir, A., Zohra, M., Atik, F. (2011). Antibacterial activity of essential oils from *Cistusla daniferus* and *Lavandula stoechasl*. *International Journal of Pharm Tech Research* **3**: 484-7.
17. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 2nd ed. *NCCLS document M27-A2*. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- منابع**
1. Ahlem, S., Khaled, H., Wafa, M., Sofiane, B.D., Jean-Claude, M., Abdelfatth, F. (2009). Oral administration of *Eucalyptus globules* extract reduces the alloxan-induced oxidative stress in rats. *Chemico-Biological Interactions* **181**: 71-6.
 2. Aimer, G., Sander, K. (2008). Mastitis in cattle treated with Itraconazole. *Veterinary Medicine Journal* **16**: 448-59.
 3. Auria, D., Teca, M., Strippoli, V. (2005). Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelia form. *Medical Mycology* **43**: 391-6.
 4. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils, a review. *Food Chemistry and Toxicology* **46**: 446-75.
 5. Barchiesi, F., Schimizzi, A.M., Fothergill, A.W., Scalise, G., Rinaldi, M.G. (2000). In vitro activity of the new echinocandin antifungal, MK-0991, against common and uncommon clinical isolates of *Candida* species. *European Journal of Clinical Microbiology* **18**: 302-14.
 6. Bokaeian, M., Nakhaee, A., Moodi, B., Khazaei, H.A. (2010). *Eucalyptus globolus* treatment of candidiasis in normal and diabetic rats. *Iranian Biomedical Journal* **14**: 121-6.
 7. Clarke, M., Davies, D.P. (2002). Neonatal systemic candidiasis treated with Miconazole. *British Medical Journal* **281**: 354-64.
 8. Elaissi, A., Marzouki, H., Medini, H., Khouja, M.L., Farhat, F., Lyenne, F., Harzallah-Skhiri, F., Chemli, R. (2010). Variation in volatile leaf oils of thirteen *Eucalyptus* species harvested from Souinet arboreta (Tunisia). *Chemistry and Biodiversity* **7**: 909-21.
 9. El-Ghorab, A.H., El-Massry, K.F., Marx, F., Fadel, H.M. (2003).

- Eucalyptus* species in Iran. *Journal of Herbs Spices Medical Plants* **15**: 106-20.
27. Singh, H.P., Batish, D.R., Kohli, R.K. (2002). Antifungal activity of the Volatile oil of *Eucalyptus citriodora*. *Fitoterapia* **73**: 261-70.
 28. Takahashi, T., Kokubo, R., Sakaino, M. (2004). Antimicrobial activities of *Eucalyptus* leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculate*. *Letters in Applied Microbiology* **39**: 60-4.
 29. Tyagi, A.K., Malik, A. (2011). Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry II* **126**: 228-35.
 30. Zoucher, D., Nottelen, H. (2007). In vitro activities of Itraconazole and Fluconazole on *Candida* species. *Revue de Mycologie* **12**: 213-25.
 18. Negahban, M., Moharramipour, S. (2007). Fumigant toxicity of *Eucalyptus intertexta*, *Eucalyptus sargentii* and *Eucalyptus camaldulensis* against stored-product beetles. *Journal of Applied Entomology* **131**: 256-61.
 19. Pinto, E., Pina-Vaz, C., Salgueiro, L., Goncalves, A., Rodrigues, A., Martinez-de-Oliveira, J. (2006). Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and *Dermatophyte* species. *Journal of Medical Microbiology* **55**: 1367-73.
 20. Pinto, A., Marbot, R., Quert, R., Garcia, H. (2002). Study of essential oils of *Eucalyptus* grown in Cuba. *Flavour Fragrance Journal* **17**: 1-14.
 21. Prentice, A.G., Warnock, D.W., Johnson, S.A.N., Phillips, M.J., Oliver, D.A. (1999). Multiple dose pharmacokinetics of an oral solution of Itraconazole in autologous bone marrow transplant recipients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **43**: 247-52.
 22. Rakotonirainy, M.S., Lavédrine, B. (2005). Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control the biocontamination in libraries and archives storage areas. *International Biodeterioration and Biodegradation* **55**: 141-7.
 23. Rongioletti, F., Robert, E., Tripodi, S., Persi, A. (2001). Treatment of onychomycosis with Itraconazole. *Journal of Dermatological Treatment* **2**: 145-60.
 24. Sarma, G., Boro, B.R, Sarmah, A.K. (1998). Mycotic abortion in a cow. *Veterinary Record* **105**: 331-40.
 25. Sefidkon, F., Assareh, M.H., Abravesh, Z., Barazandeh, M.M. (2007). Chemical composition of the essential oils of four cultivated *Eucalyptus* species in Iran as medicinal plant. *Iranian Journal of Pharmacological Research* **6**: 135-40.
 26. Sefidkon, F., Bahmanzadegan, A., Assareh, M.H., Abravesh, Z. (2009). Seasonal variation in Volatile oil of

Evaluation of the Effects of Two Herbal Essences of *Eucalyptus* and *Lavanda* on the Growth of *Candida albicans* animal Strains Resistant and Sensitive to Itraconazole

Fozouni, L.^{1*}, Bayat, M.², Roodbar Mohammadi, Sh.³, Shah Hosseini, M.H.⁴

1- PhD Student of Mycology, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Associate Professor, Department of Mycology, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Department of Mycology, Faculty of Medicine, University of Tarbiatmodares, Tehran, Iran

4- Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Microbiology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received Date: 2 June 2013

Accepted Date: 12 August 2013

Abstract

Candidiasis is a kind of fungal disease that the most common causative agent in both human beings and livestock is *Candida albicans*. With respect to the increasing resistance of fungi to anti-fungal medicine and also medical restrictions in treating fungal diseases such as high expenses and the side-effects of these medicines, it is vital to study combinations like medical herbs which can replace them. The aim of the present study was to investigate the effects of two herbal essences of eucalyptus and lavanda on the growth of clinical strains of *Candida albicans* taken from livestock with mucosal and cutaneous infections, and to compare them with *Candida albicans* resistant and sensitive to Itraconazole. The study was conducted over 20 *Candida albicans* taken from livestock (cow and dog) infected cutaneous and mucosal candidiasis. The degree of samples' sensitivity to Eucalyptus and Lavanda were determined through applying broth microdilution method. In this method, essences were first dissolved in DMSO and were then diluted on the ratio of 1 to 100 with the RPMI culture medium. Serial dilutions were then prepared from them in microplates, and their MICs were finally determined after the inoculation of yeast samples and within the incubation period and by comparing them with the control wells. In the present study, the MIC of eucalyptus against *Candida albicans* was determined at 4-1024 µl/ml, in which the most growth fluctuations it had were seen in the densities of 64 and 32 µl/ml. Also, the MIC of Lavanda was determined at 1-256 µl/ml, and the most fluctuations it had in its growth were in the densities of 16 and 8 µl/ml. The results of the study proved that eucalyptus and Lavanda essences have a very good anti-fungal effect on *Candida albicans*. In this study, the essences of both Lavanla and eucalyptus showed good anti-candidiasis effects, and no significant difference was observed in the MICs of strains sensitive and resistant to Itraconazole.

Keywords: *Candida albicans*, Eucalyptus, Lavanda, Essence, Livestock, MIC.

*Corresponding author: Fozouni, L.

Address: PhD Student of Mycology, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Tel: 0151- 2214990

Email: lili_kia@yahoo.com