

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

چکیده

دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۱۸ ویرایش: ۱۳۹۶/۰۵/۲۵ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۰۱ آنلاین: ۱۳۹۶/۱۱/۱۰

زمینه و هدف: ماده‌ای بدون رنگ و معطر به نام 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 ۱۳۹۴ تا آذر ۱۳۹۵ 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 برات دیلوشن آزمایش شدند.

یافته‌ها: از ۴۰ سویه کاندیدایی شناسایی شده در این مطالعه، ۹۵٪ کاندیدا آلبیکنس و ۵٪ کاندیدا آفریکانسا بودند. در آزمون همبست، میانگین MIC (حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد قارچ) ۲-فنیل اتانول و کلوتریمازول به‌تنهایی به ترتیب $320.0 \pm 0 \mu\text{g/ml}$ و $56 \pm 40/16 \mu\text{g/ml}$ بود و بین مقادیر MIC کلوتریمازول به‌تنهایی و در همبست، تفاوت معناداری وجود داشت ($P=0/021$).

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.

نیلوفر مجدآبادی^۱، مهربان فلاحتی^{۲*}
فریبا حیدری کهن^۳، شیرین فره‌یار^۴
پروانه رحیمی مقدم^۵، مهتاب اشرفی خوزانی^۶

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.

۴- گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، بزرگراه شهید همت، دانشگاه علوم پزشکی ایران.
کدپستی: ۱۴۴۹۶۱۴۵۳۵ | تلفن: ۸۸۶۲۲۶۵۳-۰۲۱
E-mail: mehrabanfalahati@yahoo.com

مقدمه

Candida albicans, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*، قارچ‌های *Candida dubliniensis*، *Saccharomyces cerevisiae*، *Rhizopus nigricans*، *Aspergillus niger*، *Kluyveromyces marxianus* و *Neurospora crassa* اثر ضد میکروبی دارد.^{۱-۵}

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

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*

روش بررسی

این مطالعه به صورت مداخله‌ای از ابتدای اسفند ۱۳۹۴ 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، به مدت شش ماه (از ابتدای اسفند ۱۳۹۴ تا پایان مرداد ۱۳۹۵) انتخاب و تعداد ۲۰۰ بیمار براساس میزان شیوع ولوواژینیت کاندیدایی عودکننده در ایران محاسبه شد،^{۱۶} 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 سواب پنبه‌ای سترون از زنان دارای علائم مراجعه‌کننده به کلینیک زنان بیمارستان لولاگر گرفته شد. سپس سواب‌ها در لوله‌های فالكون 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 به ترتیب انجام شد. به منظور تهیه لام مستقیم از نمونه واژن موجود در لوله فالكون، ۱-۲ 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 به همراه هایف حقیقی یا کاذب نشان‌دهنده وجود گونه‌های کاندیدا بود.

سپس نمونه‌ها جهت شناسایی اولیه بر روی محیط کروم آگار کشت داده شدند و به مدت 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)

رشته‌ای و تشکیل جرم تیوب در کاندیدا آلبیکنس جلوگیری می‌کند.^{۷،۳،۶،۹} این الکل از تغییر حالت مورفولوژیکی از فرم مخمری به فرم رشته‌ای بیش از ۵۰٪ جلوگیری می‌کند،^{۹،۱۰} و نقش انگیزان (سیگنالینگ) مورفوژنتیک را در کاندیدا آلبیکنس بازی می‌کنند، همچنین به‌عنوان مولکول انگیزان در بعضی از باکتری‌ها به‌کار می‌رود.^{۹،۱۰} 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 پروتئین‌های درگیر در انتقال سیگنال در غشا هستند و تداخل در انتقال سیگنال‌ها برای مورفوژنز فرم مخمری به هایفی ضروری است.^۶

ایمیدازول‌ها مانند کلوتریمازول اولین آزول‌های توسعه‌یافته هستند. اما به دلیل 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 به دلیل 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 ارگانسیم‌های 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.^{۱۱}

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.

با این حال عود بیماری در حدود نیمی از موارد در مدت کوتاهی پس از اتمام دوره‌ی درمانی رخ می‌دهد.^{۱۳،۱۴} 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.

برده شدند.

بر اساس پروتکل M27-S3 CLSI تهیه شدند. برای تهیه محلول استوک با $6400 \mu\text{g/ml}$ 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^{۱۹}، مقدار مناسبی از ۲-فنیل اتانول با دی‌متیل سولفوکساید رقیق شد.^{۲۱} سپس استوک اولیه را با فیلتر میلی‌پور با قطر منفذ $0.22 \mu\text{m}$ فیلتر کردیم. رقت‌های پایین‌تر دارو در ابتدای هر روز کاری از غلظت 6400 تا $100 \mu\text{g/ml}$ به صورت سریالی در دی‌متیل سولفوکساید تهیه شدند. پس از تهیه استوک‌های دارویی، از کشت تازه کاندیدا (۴۸-۲۴ ساعت انکوباسیون در 35°C) سوسپانسیون مخمری در سرم فیزیولوژی 0.085% تهیه و با استفاده از اسپکتروفوتومتر (Novaspec II Visible (Spectrophotometer, Pharmacia LKB Biotechnology, Cambridge, England) در طول موج 530 nm و تغییر دادن تراکم سلولی، عبور نوری $90-85\%$ را ایجاد کردیم که حاوی 1.0×10^6 سلول در هر میلی‌لیتر بود. سپس این سوسپانسیون به نسبت $1:50$ و $1:20$ در محیط RPMI 1640 مایع با گلوتامین، بدون بی‌کربنات و با فنول رد که به‌عنوان شاخص PH است (Roswell park memorial institute) (R6504 Sigma, Germany) رقیق شد تا سوسپانسیون به‌دست‌آمده حاوی $1.0^3 \times 10^5$ سلول باشد. جهت اندازه‌گیری MIC کلوتریمازول و ۲-فنیل اتانول به‌تنهایی از پلیت‌های استریل ۹۶ خانه دردار (Becton Dickinson, USA) استفاده شد که میزان $100 \mu\text{l}$ از دارو کلوتریمازول به‌ترتیب از غلظت $128 \mu\text{g/ml}$ تا غلظت $0.03125 \mu\text{g/ml}$ به صورت عمودی در پلیت ریخته شد و در مورد ۲-فنیل اتانول نیز میزان $100 \mu\text{l}$ از ۲-فنیل اتانول به‌ترتیب از غلظت $6400 \mu\text{g/ml}$ تا غلظت $100 \mu\text{g/ml}$ به صورت عمودی در پلیت ریخته شد.

$100 \mu\text{l}$ سوسپانسیون مخمری به همه چاهک‌ها اضافه شد. به ستون کنترل مثبت $100 \mu\text{l}$ محیط RPMI 1640 و $100 \mu\text{l}$ سوسپانسیون مخمری اضافه شد. در ستون کنترل منفی هم $200 \mu\text{l}$ محیط RPMI 1640 ریخته شد و یک چاهک هم به‌عنوان کنترل حلال دی‌متیل سولفوکساید در نظر گرفته شد که حاوی $100 \mu\text{l}$ محیط RPMI 1640 به‌همراه دی‌متیل سولفوکساید و $100 \mu\text{l}$ سوسپانسیون مخمری بود. میکروپلیت‌ها را به مدت ۳-۵ دقیقه بر روی شیکر قرار داده و سپس آن‌ها را در انکوباتور 35°C گذاشته و پس از ۴۸ ساعت آن‌ها را مورد بررسی قرار دادیم. برای خوانش میکروپلیت‌ها به صورت چشمی

تشخیص نهایی گونه‌های کاندیدا با استفاده از روش مولکولی Polymerase chain reaction (PCR) توسط پرایمرهای یونیورسال ITS4 و ITS1 (TAG- Copenhagen, Denmark) و تعیین توالی انجام شد، به‌طور خلاصه نمونه‌های کاندیدیایی 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 به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در انکوباتور 37°C قرار داده شدند، بر اساس پروتکل استخراج سریع (DNA) Deoxyribonucleic acid از کلنی کاندیدا، DNA استخراج شد،^{۱۷} پرایمرها خریداری و بر اساس دستورکار سازنده با میزان مناسبی از آب مقطر سترون مخلوط شدند، سپس به‌ازای هر نمونه به این ترتیب عمل شد: Master Mix (Ampliqon- 180301, Denmark) $12/15 + \lambda$ ITS4 + $9/15 + \lambda$ آب مقطر + 1λ DNA الگو.

در لوله کنترل منفی به‌جای DNA الگو، 1λ 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 دایلوژن برابر پروتکل Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3^{۱۸} بر روی 40 گونه کاندیدیایی جدا شده از ولوژنیت کاندیدیایی مزمن و عودکننده برابر مراحل زیر انجام شد.

برای تهیه محلول استوک کلوتریمازول (C6019 Sigma, Germany) با غلظت $128 \mu\text{g/ml}$ بر اساس پروتکل M27-A3 CLSI^{۱۸} 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 دی‌متیل سولفوکساید (102952-Merck, Germany) تا زمانی که پودر دارو به‌طور کامل حل شد، مخلوط کردیم. مخلوط حاصل را با فیلتر میلی‌پور با قطر منفذ $0.22 \mu\text{m}$ (Membrane Solutions, China) فیلتر کردیم. رقت‌های پایین‌تر دارو در ابتدای هر روز کاری از غلظت 128 تا $0.03125 \mu\text{g/ml}$ به صورت سریالی

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)، سینرژیسیم (اثر هم‌افزایی)، آنتاگونیسم (اثر کاهندگی) و یا بی‌اثر بودن داروها در همبست تعیین و تفسیر نتایج FICI به‌این‌صورت انجام شد: $0/5 \leq \text{سینرژیسیم}$ ، $0/5 < \text{بی‌اثر}$ ، ≥ 4 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 $P < 0/05$ ، از لحاظ آماری معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

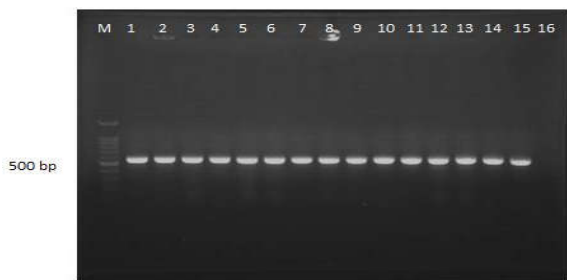
گستره‌ی سنی بیماران مبتلا به ولوواژینیت کاندیدایی مزمن و عودکننده، بین ۵۷-۱۹ سال و میانگین سن آن‌ها $36/17 \pm 10/25$ سال بود. همچنین، بیشتر بیماران (۲۵٪) در گروه سنی ۳۵-۳۱ سال قرار داشتند. بیشتر بیماران تحصیلات دیپلم و فوق‌دیپلم (۴۲/۵٪) و وضعیت اقتصادی متوسط (۵۲/۵٪) داشتند، همچنین بیشتر بیماران خانه‌دار (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 (۶۷/۵٪) 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 ۴۰

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 ۴۸ 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 ۹۶ خانه دردار استفاده شد که میزان $50 \mu\text{l}$ از کلوتریمازول به‌ترتیب از غلظت $16 \mu\text{g/ml}$ تا غلظت $0/3125 \mu\text{g/ml}$ به‌صورت عمودی از ستون یک تا ۱۱ در پلیت ریخته شد. $50 \mu\text{l}$ از ۲-فنیل اتانول به‌ترتیب از غلظت $6400 \mu\text{g/ml}$ تا غلظت $100 \mu\text{g/ml}$ به‌صورت افقی به‌ترتیب از ردیف A تا G ریخته شد. به ردیف H و ستون ۱۱، $50 \mu\text{l}$ محیط RPMI 1640 اضافه شد تا ردیف H کلوتریمازول به‌تنهایی و ستون ۱۱، ۲-فنیل اتانول به‌تنهایی باشد. $100 \mu\text{l}$ سوسپانسیون مخمری به همه چاهک‌ها اضافه شد. دو خانه در ستون ۱۲ به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند که $100 \mu\text{l}$ محیط RPMI 1640 و $100 \mu\text{l}$ سوسپانسیون مخمری به آن‌ها اضافه شد. دو خانه هم در ردیف ۱۲ به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند که $200 \mu\text{l}$ محیط RPMI 1640 در آن‌ها ریخته شد و یک چاهک هم به‌عنوان کنترل حلال دی‌متیل‌سولفوکساید در نظر گرفته شد که حاوی $100 \mu\text{l}$ محیط RPMI 1640 به‌همراه دی‌متیل‌سولفوکساید و $100 \mu\text{l}$ 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 ۳-۵ دقیقه بر روی شیکر قرار داده و آن‌ها را در انکوباتور 35°C گذاشته و پس از ۷۲-۴۸ ساعت آن‌ها را مورد بررسی قرار دادیم. برای خوانش میکروپلیت‌ها به‌صورت چشمی از آینه استفاده کردیم.



شکل ۱: کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا آفریکانا جدا شده از بیمار در آزمون PCR
 ستون M، مارکر ۱۰۰ bp، 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 حساس ≤ 0.5	تعداد (درصد)
کاندیدا آلبیکنس	۷ (۱۷/۵)	۳۱ (۷۷/۵)
کاندیدا آفریکانا	-	۲ (۵)

نمونه‌ی ولوواژینیت مزمن ۹۵٪ نمونه‌ها کاندیدا آلبیکنس (مورد ۳۸) 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. MIC90 و MIC50 کلوتریمازول نیز به‌ترتیب ۱۶ و ۶۴ $\mu\text{g/ml}$ و ۲-فنیل اتانول $3200 \mu\text{g/ml}$ 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 0.28 ± 0.08 و میانگین MIC کلوتریمازول به‌تنهایی $56 \pm 40 / 16 \mu\text{g/ml}$ و در همبست با ۲-فنیل اتانول $2 \pm 1 / 0.9 \mu\text{g/ml}$ بود (جدول ۳)، همچنین بر پایه‌ی Paired samples t-test، بین مقادیر MIC کلوتریمازول به‌تنهایی و در همبست، تفاوت معناداری وجود داشت ($P=0.021$). میانگین MIC ۲-فنیل اتانول به‌تنهایی $3200 \pm 0 \mu\text{g/ml}$ و در همبست با کلوتریمازول $733/33 \pm 163/29 \mu\text{g/ml}$ بود (جدول ۳)، و همچنین، بین مقادیر MIC ۲-فنیل اتانول به‌تنهایی و در همبست، تفاوت معناداری وجود داشت ($P=0.001$), همچنین براساس Mann-Whitney U test، تفاوت معناداری بین میانگین MIC ۲-فنیل اتانول به‌تنهایی و میانگین MIC کلوتریمازول به‌تنهایی وجود داشت ($P=0.0001$).

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

گونه	تعداد (%)	MIC ^۱ کلوتریمازول	MFC ^۲ کلوتریمازول	MIC ^۱ ۲-فنیل اتانول	MFC ^۲ ۲-فنیل اتانول
کاندیدا آلبیکنس	۳۸ (۹۵)	محدوده* $25/29 \pm 59/33$ میانگین* $0/128-5$	محدوده* $31/33 \pm 33/44$ میانگین* $0/128-5$	محدوده* $3200-800$ میانگین* $2631/58$	محدوده* $6400-1600$ میانگین* $3242/1415 \pm 1086$
کاندیدا آفریکانا	۲ (۵)	محدوده* $8/10 \pm 5/61$ میانگین* $16-1$	محدوده* $8/10 \pm 5/61$ میانگین* $16-1$	محدوده* $1600-1600$ میانگین* 1600	محدوده* $3200-1600$ میانگین* $1131 \pm 2400/37$
استاندارد کاندیدا گلابراتا CBS ۱۳۸	۱	محدوده* $0/25$ میانگین* $-$	محدوده* $0/25$ میانگین* $-$	محدوده* 1600 میانگین* $-$	محدوده* 1600 میانگین* $-$
کل ^۱	۴۰ (۱۰۰)	محدوده* $24/28 \pm 73/87$ میانگین* $0/128-5$	محدوده* $30/33 \pm 18/004$ میانگین* $0/128-5$	محدوده* $3200-800$ میانگین* $932 \pm 2580/38$	محدوده* $6400-1600$ میانگین* $1403 \pm 3200/29$

* میانگین‌ها و محدوده‌های غلظت برحسب $\mu\text{g/ml}$ بیان شده‌اند.

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

^۲ حداقل غلظت مانع‌کنندگی از رشد. ^۳ حداقل غلظت کشندگی قارچ.

جدول ۳. FICI، MIC کلوتریمازول و ۲-فنیل اتانول به تنهایی و در همبست پس از ۴۸ ساعت (میکرو برات دایلوژن)

گونه	حساسیت یا مقاومت نمونه	MIC ^۱ کلوتریمازول در همبست	MIC ^۱ کلوتریمازول به تنهایی	MIC ^۱ ۲-فنیل اتانول در همبست	MIC ^۱ ۲-فنیل اتانول به تنهایی	FICI ^۲
		(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	
کاندیدا آلبیکنس	مقاوم	۲	۱۲۸	۴۰۰	۳۲۰۰	۰/۱۴
کاندیدا آلبیکنس	مقاوم	۲	۳۲	۸۰۰	۳۲۰۰	۰/۳۱
کاندیدا آلبیکنس	مقاوم	۴	۶۴	۸۰۰	۳۲۰۰	۰/۳۱
کاندیدا آلبیکنس	مقاوم	۱	۳۲	۸۰۰	۳۲۰۰	۰/۲۸
کاندیدا آلبیکنس	مقاوم	۲	۱۶	۸۰۰	۳۲۰۰	۰/۳۷
کاندیدا آلبیکنس	مقاوم	۱	۶۴	۸۰۰	۳۲۰۰	۰/۲۶

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

بحث

اتانول به‌طور کامل از رشد مخمر ساکارومایسس سرویسیه جلوگیری می‌کند.^{۱۴} MIC‌های به‌دست‌آمده از مطالعات Kosalec و همکاران^{۲۵،۲۶} و مطالعه Han و همکاران^{۲۰} 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 ۶۵۰ µg/ml تا ۷۶۷۰ µg/ml بر روی گونه‌های مخمری و رشته‌ای می‌باشد. برخلاف پژوهش کنونی در مطالعه‌ی Chauhan و همکاران،^{۲۰} ۲-فنیل اتانول اثر قابل‌توجهی بر روی رشد و پایداری سلول‌های فاز مخمری *کاندیدا آلبیکنس* تا حدود ۴٪ (۴۰۰۰ µg/ml) نداشت و کاهش پایداری قابل‌توجه (۵۰-۴۰٪) در ۸-۶٪ (۸۰۰۰-۶۰۰۰ µg/ml) ۲-فنیل اتانول دیده شد.^۶ 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 ۴۸ ساعت ۰/۵-۱۲۸ µg/ml، میانگین MIC و MFC کلوتریمازول به ترتیب ۲۴/۷۳±۲۸/۸۷ µg/ml و ۳۰/۱۸±۳۰/۰۰۴ µg/ml و MIC50 و MIC90 به ترتیب ۱۶ µg/ml و ۶۴ µg/ml بود (جدول ۱ و ۲).

در پژوهش Shojaei و همکاران بر روی ولوواژینیت کاندیدایی مزمن، در مورد کلوتریمازول، میانگین MIC ۷/۰۵ µg/ml، میانگین MFC ۲۴/۷ µg/ml و محدوده‌ی MIC ۱-۳۲ µg/ml بود^{۲۶} که

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 ۴۸ ساعت ۳۲۰۰-۸۰۰ µg/ml بود (جدول ۴).

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 ۴۸ 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 ۶۵۰ µg/ml تا ۷۶۷۰ µg/ml گزارش کردند^{۲۶} 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 ۵۶۲۵ µg/ml حساس به ۲-فنیل اتانول هستند.^{۲۵} Han و همکاران گزارش کردند که غلظت ۳-۴ g/l (۳۰۰۰-۴۰۰۰ µg/ml) ۲-فنیل

براساس مقادیر FICI به دست آمده و تفسیر نتایج آن،^{۳۳} 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). باین‌حال 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 لینولیک کونژوگه و ۲-فنیل اتانول بر روی چند گونه‌ی کاندیدایی متداول" مصوب دانشگاه علوم پزشکی ایران در سال ۱۳۹۴ به کد ۲۷۰۷۷-۳۰-۰۵-۹۴ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی ایران اجرا شده است.

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 ۴-۰/۰۳، MIC₉₀ و MIC₅₀ به ترتیب ۰/۱۲ و ۰/۲۵ μg/ml 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 Wang, Lakshmi, Elfeky, J. و همکاران، بیشتر ایزوله‌ها حساس به کلوتریمازول بودند.^{۲۸-۳۰} همچنین در مطالعات Shojaei, Mohamadi, Zafar و همکاران، ایزوله‌های مقاوم به ترتیب ۲۱٪، ۵۵٪ و ۲۷/۵٪ بودند.^{۳۱-۳۳} که با مطالعه‌ی ما تفاوت داشت. اختلاف بین مطالعات یادشده و پژوهش کنونی می‌تواند به دلیل عدم وجود دستورکار ثابت و معین برای تفسیر نتایج حساسیت و یا مقاومت به کلوتریمازول و تفاوت در جمعیت مورد مطالعه باشد.

References

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lester G. Inhibition of growth, synthesis, and permeability in *neurospora crassa* by phenethyl alcohol. *J Bacteriol* 1965;90(1):29-37.
- Chauhan NM, Raut JS, Karuppaiyl SM. A morphogenetic regulatory role for ethyl alcohol in *Candida albicans*. *Mycoses* 2011;54(6):e697-703.
- 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.
- Egbe NE, Paget CM, Wang H, Ashe MP. Alcohols inhibit translation to regulate morphogenesis in *C. albicans*. *Fungal Genet Biol* 2015;77:50-60.
- 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.
- Campoy S, Adrio JL. Antifungals. *Biochem Pharmacol* 2017;133:86-96.
- Loeffler J, Stevens DA. Antifungal drug resistance. *Clin Infect Dis* 2003;36(Suppl 1):S31-41.
- Nguyen Y, Lee A, Fischer G. Management of chronic vulvovaginal candidiasis: a long term retrospective study. *Australas J Dermatol* 2017;58(4):e188-e192.
- 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.
- 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.
- Nazeri M, Mesdaghinia E, Moraveji SAR, Atabakhshiyani R, Soleymani F. Prevalence of vulvovaginal candidiasis and frequency of *Candida* species in women referred to gynecology obstetrics clinic at Kashan-Iran since 2008 to 2010. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2012;22(86):262-9.
- Habibian R, Jafarzadeh L, Shahriari K. Investigating the relationship between recurrent candidiasis with predisposing factors and

- 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, Purushotham 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.

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

Abstract

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

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

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 $\mu\text{g/ml}$ and 30.18 ± 33.004 $\mu\text{g/ml}$, respectively and the mean MIC and MFC of 2-phenylethanol were 2580 ± 932.38 $\mu\text{g/ml}$ and 3200 ± 1403.29 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The MIC₅₀ and MIC₉₀ of clotrimazole were 16 and 64 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The MIC₅₀ and MIC₉₀ of 2-phenylethanol were both 3200 $\mu\text{g/ml}$. 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 $\mu\text{g/ml}$ and 56 ± 40.16 $\mu\text{g/ml}$, 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.