

اثر ضد قارچی اسانس آویشن و میخک در ایزوله های بالینی ولوواژینیت کاندیدیایی عودکننده

مهسا عثمانی^۱، مرضیه قاسمی^۲، علیرضا داشی پور^۳، علی سنجرانی^۴، ناصر کیخا^{۵*}

- ۱- کارشناس ارشد ژنتیک، بیمارستان بوعلی زاهدان، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
 - ۲- دانشیار نازایی و IVF، گروه زنان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات ژنتیک در بیماری های غیرواگیر، بیمارستان علی ابن ابیطالب (ع)، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.
 - ۳- دانشیار یار گروه صنایع غذایی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، خدمات بهداشتی در مانی زاهدان، ایران.
 - ۴- کارشناس ارشد سم شناسی پزشکی، بیمارستان بوعلی زاهدان، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.
 - ۵- استادیار قارچ شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، پژوهشکده علوم سلولی، مولکولی در بیماری های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.
- *نشانی برای مکاتبه: Nasserkeikha@yahoo.com

چکیده

سابقه و هدف: ولوواژینیت کاندیدیایی عودکننده یک عفونت بسیار مهم مرتبط با زنان در سنین باروری می باشد که ممکن است فرد حداقل چهاربار در سال مبتلا به این عفونت شده باشد. این مطالعه با هدف بررسی اثر اسانس آویشن و میخک در ایزوله های بالینی ولوواژینیت کاندیدیایی عودکننده انجام شد.

روش کار: در این مطالعه تجربی از ۶۰ بیمار مشکوک به ولوواژینیت کاندیدیایی عودکننده مراجعه کننده به مراکز درمانی زاهدان طی یک دوره ۶ ماهه نمونه گیری شد. تشخیص قطعی کاندیداها با استفاده از تست های فنوتیپی (لوله زایا، تولید کلامیدوکونیدی و پیگمان کاندیدا روی محیط کروم آگار) و ژنوتیپی انجام شد. تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) با استفاده از روش برات میکرودیالوژن اسانس های آویشن، میخک و داروی فلوکونازول در ایزوله های بالینی انجام گرفت.

یافته ها: فراوانی کاندیدا آلبیکنس ۵۶/۶۶٪ و کاندیدا کروزی ۴۳/۳۴٪ بدست آمد. MIC90 اسانس های آویشن و میخک برای ایزوله های بالینی ولوواژینیت عودکننده کاندیدا آلبیکنس به ترتیب ۳/۹ و ۰/۹۷ میکرولیتر در میلی لیتر بدست آمد ($p \geq 0.05$).

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که گونه های آلبیکنس و کروزی کاندیدا به ترتیب از عوامل شایع ایجاد کاندیدیازیس ولوواژینیت عودکننده هستند. در شرایط آزمایشگاهی اسانس میخک در مقایسه با اسانس آویشن اثر ضد قارچی بیشتری در مهار عوامل ایجاد کننده ولوواژینیت عودکننده کاندیدیایی داشت.

واژه های کلیدی: کاندیدا، اسانس، ولوواژینیت عودکننده

مقدمه

مخمری از سال ۱۹۸۰ تا ۱۹۹۰ نشان دهنده افزایش دو برابری واژینیت کاندیدیایی بوده است. حدود ۴۵ درصد زنان دو بار یا بیش از دو بار در طول زندگی به این عفونت مبتلا می شوند. به طور تقریبی ۵ درصد زنان در سال سه بار و یا بیشتر به این بیماری مبتلا می شوند که به آن ولوواژینیت کاندیدیایی عودکننده (Recurrent Vulvovaginal Candidiasis (RVVC)) گفته میشود (۲). عوامل مستعد کننده اصلی در این بیماری شامل حاملگی، سرکوب سیستم ایمنی، دیابت ملیتوس کنترل نشده، مصرف قرصهای ضد بارداری، درمان آنتی

ولوواژینیت کاندیدیایی عودکننده یک عفونت مزمن بوده که زنان را در تمام سنین تحت تاثیر قرار می دهد و به جنبه های فرهنگی و اقتصادی وابستگی ندارد و از طرفی توسط گونه های قارچی مخمری جنس کاندیدا ایجاد می شود. هم چنین به طور معمول ۷۵ درصد از زنان حداقل یک بار در سال در طول زندگی خود مبتلا به کاندیدیازیس واژینال می شوند که این امر از نظر مراقبت های بهداشتی قابل توجه است (۱). ولوواژینیت کاندیدیایی بعد از عفونت های باکتریایی دومین عامل واژینیت در زنان بوده و افزایش تجویز داروهای مربوط به عفونت های

مهم از لحاظ پزشکی، علاوه بر زمان بر بودن، امکان شناسایی دقیق این گونه ها را فراهم نمی کند، به همین دلیل روشهای مبتنی بر PCR در حال جایگزینی برای این متدهای مرسوم هستند. (۹) تاکنون روشهای مولکولی زیادی از جمله RFLP-PCR (۶ و ۱۰)، Multiplex PCR (۱۱)، توالی یابی نواحی خاص ژنوم (۸) و Real time PCR (۱۲) برای شناسایی گونه های کاندیدا استفاده شده است. به دلیل بروز مقاومت دارویی در مقابل داروهای شیمیایی رایج به خصوص در جنس مخمر *کاندیدا* و همچنین وجود تنوع بسیار زیاد ترکیبات دارای خواص درمانی در گیاهان موجب شده است تا از گیاهان به عنوان منبعی مهم به منظور جستجوی ترکیبات جدید دارویی و سنتز داروهای موثر استفاده نمود (۱۳ و ۱۴). گیاه آویشن^۱ یکی از گیاهان تیره نعناعی^۲ است که در نواحی مختلف مدیترانه و برخی نواحی آسیا می روید و امروزه در مناطق مختلف جهان و از جمله در ایران کشت و تولید می شود. آویشن محتوی ۰/۸ تا ۲/۶ درصد (معمولاً ۱ درصد) اسانس است. مهمترین اجزای تشکیل دهنده اسانس آن را تیمول^۳ و کارواکرول^۴ تشکیل می دهد که دارای خاصیت ضد میکروبی می باشند (۱۵ و ۱۶). گیاه میخک از خانواده مورد میباشد که حاوی ۱۴-۲۱ درصد اسانس است. اسانس میخک حاوی ۷۰-۸۰ درصد از یک ترکیب فنلی به نام اوگنول است که خاصیت آنتی اکسیدانی دارد. اسانس ها فعالیت های ضد میکروبی گسترده ای دارند و در بسیاری از موارد سبب از بین بردن باکتریها، قارچ ها و ویروس ها می شوند، بدون اینکه اثرهای نامطلوبی بر سلامت مصرف کننده داشته باشند. عمده ترین ترکیبات شیمیایی مشترک در اسانس های گیاهی شامل تیمول، آلفا پینن، بتا پینن، کارواکرول، لینالول، ژرمارکن و کومین آلدئید میباشد (۱۷ و ۱۸). هدف این مطالعه شناسایی عوامل ایجاد کننده ولوواژنیت کاندیدایی عود کننده و ارزیابی اثرات ضد قارچی عصاره آویشن و میخک بر علیه این عوامل کاندیدایی جدا شده از بیماران مبتلا به ولوواژنیت کاندیدایی عود کننده بود.

روش کار

در این مطالعه تجربی نمونه گیری از ۶۰ بیمار مشکوک به ولوواژنیت کاندیدایی عودکننده مراجعه کننده به مراکز درمانی

باکتریال، استفاده از وسایل داخل رحمی، فعالیت جنسی زیاد و نقص ایمنی موضعی ناحیه واژن می باشد. مشخص ترین علامت واژینیت کاندیدایی، خارش واژن است، در این بیماری سوزش ادرار بسیار شایع بوده و ترشحات واژن افزایش می یابد، از علائم بالینی تورم، قرمزی و شقاق واژن می باشد و دیواره واژن قرمز رنگ با پلاک های چسبنده خشک و سفید دیده می شود. رایج ترین روش تشخیص، مبتنی بر مشاهده مستقیم میکروسکوپی لام بدست آمده از بیمار به منظور یافتن عوامل قارچی کاندیدایی است (۳ و ۴). تاکنون بررسی های انجام گرفته برای کشف مکانیسم عامل واژینیت های عودکننده ناموفق بوده اند. عامل بیشتر موارد بیماری های کاندیدایی، گونه ی *کاندیدا آلبیکنس* است ولی در بیماران مبتلا به ولووواژنیت کاندیدایی عود کننده ۱۵-۴۷ درصد موارد توسط گونه های غیر *آلبیکنس* ایجاد می شوند. در مواردی که *کاندیدا آلبیکنس* عامل ایجاد کننده باشد، به ندرت مقاومت دارویی مشاهده می شود، در حالی که در عفونت های با عوامل *کاندیدا گلابراتا*، *کاندیدا تروپیکالیس* و *کاندیدا کروزی* فقدان حساسیت به داروهای ضد قارچی آزول می تواند عامل عفونت مزمن یا راجعه باشد (۵). استفاده ی بی رویه از داروهای ضد قارچی به عنوان یکی از عوامل افزایش کلینزاسیون گونه های غیر *آلبیکنس* مورد توجه می باشند زیرا رژیم های درمانی مورد استفاده در بیماران که اغلب به صورت یک دوره ۱ تا ۳ روزه از داروهای ایمیدازول بوده ممکن است رشد *کاندیدا آلبیکنس* را متوقف نماید و از طرفی باعث رشد بیش از حد گونه های غیر *آلبیکنس* کاندیدا شود. همچنین از آنجایی که تعداد داروهای ضد قارچی موجود در بازار محدود می باشد و با توجه به مطالعات انجام شده مصرف بیش از حد آنها باعث افزایش مقاومت دارویی کاندیداها میشود. بنابراین شناسایی دقیق گونه های کاندیدا اهمیت به سزایی در درمان و مقابله با افزایش مقاومت کاندیدایی به داروهای ضد قارچی خواهد داشت (۵-۷). اگرچه مهمترین پاتوژن این جنس *کاندیدا آلبیکنس* است اما یک شیوع گسترده توسط دیگر گونه های *کاندیدا* نظیر *کاندیدا تروپیکالیس*، *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا کروزی* مشاهده شده است. این تغییر اپیدمیولوژیکی به دلیل کاهش حساسیت این گونه های نو ظهور به داروهای ضدقارچ می تواند نگران کننده باشد (۸). بنابراین شناسایی دقیق گونه های کاندیدا به منظور انتخاب بهترین روش درمان، جلوگیری از مقاومت های دارویی و کنترل عفونت های ایجاد شده توسط این گونه ها بسیار ضروری است. استفاده از تست های بیوشیمیایی برای شناسایی مخمرهای

کلرامفنیکل کشت و در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. سپس بر اساس شمارش تعداد کلنی های رشد کرده از هر یک از رقت های اسانس آویشن و میخک (خریداری شده از شرکت باریج اسانس ایران و در ظروف تیره نگهداری گردید) و فلوکونازول (داروسازی امین، ایران) نسبت به سویه های استاندارد (کاندیدا آلبیکنس ATCC1023 و کاندیدا کروزی PTCC5297)، مقادیر حداقل غلظت مهار کنندگی از رشد ایزوله های بالینی بدست آمد. تحلیل داده های آماری با استفاده از نرم افزار اس پی اس نسخه ۲۰ و هم چنین با استفاده از آزمونهای توصیفی شامل فراوانی درصد و جداول توصیفی انجام گرفت و برای مقایسه میانگین MIC بین گروههای مورد بررسی آزمون آنالیز واریانس یکطرفه استفاده شد و سطح معناداری $P < 0/05$ لحاظ گردید.

یافته ها

مهمترین اجزای تشکیل دهنده اسانس های آویشن و میخک با استفاده از روش MS-GC به ترتیب تیمول ۲۲/۹۶٪ و اوگنول ۷۳/۳۵٪ بودند. بررسی های فنوتیپی و PCR-RFLP ایزوله های بالینی ولوواژینال عود کننده نشان داد که ۳۴ نمونه معادل ۵۶/۶۶٪ کاندیدا آلبیکنس و ۴۳/۳۴٪ (۲۶ نمونه) کاندیدا کروزی می باشند. MIC₉₀ آویشن و میخک برای ایزوله های بالینی ولوواژینیت عودکننده کاندیدا آلبیکنس به ترتیب ۳/۹ و ۳۱/۲۵ و برای کاندیدا کروزی ۱۵/۷۵ و ۰/۹۷ بدست آمد که در جدول شماره یک آمده است.

شهر زاهدان طی یک دوره ۶ ماهه به صورت تصادفی انجام شد. نمونه ها توسط متخصص مربوطه با سواب استریل از جدار خلفی واژن گرفته و به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از بررسی مستقیم میکروسکوپی، جهت عملیات فارچ شناسی (فنوتیپی)، نمونه ها با استفاده از آزمون های فنوتیپی مانند تشکیل جرم تیوب (لوله زایا) و تولید کلامیدوسپور روی محیط کورن میل آگار حاوی یک درصد توئین ۸۰ و بویژه رنگ کلنی بر روی محیط کروم آگار کاندیدا مورد شناسایی قرار گرفت. در نهایت تشخیص قطعی گونه های کاندیدا با استفاده از RFLP-PCR و تکثیر ITS1-5.8S-ITS2 ژن ریپوزومال DNA انجام شد. تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (*Minimum inhibitory concentration*) با استفاده از روش میکرو برات میکرو دایلوژن در ایزوله های بالینی انجام شد. ابتدا درون چاهک ها ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت (*Roswell Park Memorial Institute1640*) RPMI1640 ریخته و غلظت های متوالی از اسانس آویشن، میخک و داروی فلوکونازول تهیه و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلول مخمری از هر کدام از سویه های کاندیدا با تراکم $10^3 \times 0/5$ سلول در هر میلی لیتر به آن اضافه گردید. این آزمون به صورت سه بار تکرار انجام شد. پلیت ۹۶ خانه ای در انکوباتور شیکردار ۳۵ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۴۸ ساعت گذاشته شد. پس از طی زمان انکوباسیون ۱۰ میکرولیتر از محتویات چاهک ها بر روی پلیت های حاوی محیط سابورو دکستروز آگار حاوی

جدول ۱: حساسیت دارویی ایزوله های بالینی ولوواژینیت عود کننده ناشی از کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا کروزی تیمار شده با اسانس های آویشن و میخک در شرایط آزمایشگاهی

| ایزوله های بالینی دارو ولوواژینیت کننده | محدوده MIC (میکروگرم در میلی لیتر) | MIC ₉₀ (میکروگرم در میلی لیتر) | MIC ₅₀ (میکروگرم در میلی لیتر) | مقاوم به دارو (تعداد) |
|---|------------------------------------|---|---|-----------------------|
| اسانس آویشن | ۰/۹۷-۳/۹ | ۳/۹ | ۱/۹۵ | - |
| کاندیدا آلبیکنس | ۷/۸۱-۳۱/۲۵ | ۳۱/۲۵ | ۷/۸۱ | - |
| فلوکونازول | ۱-۸ | ۴ | ۱ | ۳۴ |
| اسانس آویشن | ۷/۸۱-۱۵/۶۲ | ۶۲/۱۵ | ۷/۸۱ | - |
| کاندیدا کروزی | ۰/۲۴-۰/۹۷ | ۰/۹۷ | ۰/۲۴ | - |
| فلوکونازول | ۲-۸ | ۸ | ۲ | ۲۶ |

بحث

کاندیدایزس ولوواژینال یک عفونت شایع است که اغلب با رشد بیش از اندازه قارچ های مخمری جنس کاندیدا بویژه گونه آلبیکنس همراه است. تجربه ارزیابی بالینی زنان مبتلا نشان داده است که در طول زندگی هر فرد حداقل یک بار به کاندیدایزس ولوواژینال مبتلا شده است. بعلاوه کاندیدایزس ولوواژینال عودکننده توانسته به طور قابل توجهی بر کیفیت زندگی افراد تاثیر گذاشته و باعث بروز علائم مختلف جسمی و روانی شود و از طرفی بار مالی قابل توجهی را برای زنان و سیستم مراقبت های بهداشتی تحمیل نماید (۱۹). از اسانس گیاهان دارویی برای درمان بسیاری از بیماری های میکروبی با توجه به مقاومت های ذاتی و اکتسابی عوامل میکروبی به داروهای رایج استفاده می شود (۲۰-۲۳). در این پژوهش با توجه به در دسترس بودن و اقبال عمومی از داروهای با پایه گیاهی و طبیعی اثر اسانس های آویشن و میخک در ایزوله های بالینی ولوواژینیت کاندیدایی عودکننده انجام شد. در مطالعه ای که Tran و همکاران (۲۰۲۲) در بررسی پیشرفت های اخیر در کاربرد اسانس ها به عنوان کاندیدهای بالقوه درمانی برای عفونت های مرتبط با کاندیدا انجام شد، نشان دادند که عصاره ها و اسانس های گیاهی از جمله میخک تاثیر ضد قارچی خوبی دارد (۲۸) که در مطالعه ما نیز میخک اثر ضد قارچی موثری داشت. یافته های Katarzina و همکاران (۲۰۱۹) در بررسی تأثیر اسانس های میخک و آویشن بر تشکیل بیوفیلم کاندیدا و توزیع روغن در سلول های مخمر نشان داد اسانس های میخک و آویشن به دلیل فعالیت ضد قارچی می توانند به طور موثر در پیشگیری از کلنیزاسیون سطوح غیرزنده آزمایش شده توسط کاندیدا استفاده شوند (۲۵). همچنین یافته های Abbas و همکاران (۲۰۲۲) در بررسی کاربرد آویشن به عنوان یک گیاه دارویی در عفونت های باکتریایی و قارچی و بررسی خواص ضددردی آن نشان داد که میتوان از آویشن به عنوان یک ترکیب ضد قارچی استفاده نمود (۲۰). در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۱۶، Mandras و همکاران به بررسی فعالیت ضد قارچی اسانسهای طبیعی در برابر گونه های کاندیدا پرداختند، نتایج آنها اثر ضد قارچی زیاد اسانسهای طبیعی مورد بررسی به ویژه آویشن و صنوبر را در برابر گونه های کاندیدایی مقاوم به فلوکونازول و وریکونازول نشان داد (۲۶). همچنین نتایج مطالعات محققان دیگر نیز حاکی از آن بود که شناخت یک داروی کارآمد و موثر برای درمان این نوع عفونت ها به عنوان یک چالش اساسی مطرح است بویژه در مواردی که عفونت ناشی از مخمرهایی غیر از کاندیدا آلبیکنس است (۲۷). در مطالعه ما نیز آویشن اثر ضد قارچی بیشتری نسبت به فلوکونازول داشت. جزایری و همکاران

حداقل غلظت مهاری بر روی رشد کاندیدا آلبیکنس برای گیاه آویشن مرتعی $2/4 \mu\text{l/ml}$ و برای گیاه آویشن کوهی $3/3 \mu\text{l/ml}$ بدست آوردند و میزان حداقل غلظت کشندگی قارچی گیاه آویشن مرتعی، $2/4 \mu\text{l/ml}$ و گیاه آویشن کوهی $4 \mu\text{l/ml}$ بدست آمد (۲۸). ضیا و همکاران حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد قارچ کاندیدا آلبیکنس (جدا شده از بیماران مبتلا به کاندیدایزس دهانی) تیمار شده با عصاره آویشن، مورت، مخلوط دو عصاره و سوسپانسیون نیستاتین را به ترتیب برابر با $0/39 \mu\text{l/ml}$ ، $12/5 \mu\text{l/ml}$ ، $0/78 \mu\text{l/ml}$ و 160IU/ml گزارش نمودند نتایج آنها نشان داد که عصاره آویشن در مقایسه با نیستاتین به عنوان یک داروی ضدقارچی در درمان کاندیدایزس می تواند مورد استفاده قرار بگیرد (۲۹). در مطالعه حاضر MIC اسانس آویشن در شرایط آزمایشگاهی برای ایزوله های بالینی کاندیدا آلبیکنس $0/97$ و برای کاندیدا کروزبی $7/81$ بدست آمد که در مقایسه با یافته های قبلی پژوهشگران غلظت بیشتری از اسانس آویشن توانسته است موجب مهار رشد عوامل بیمارزا شود که نشان از مقاوم شدن این عوامل تا حدودی دارد و این امر می تواند با توجه به اینکه بیماری از نوع عود کننده ولوواژینیت می باشد طبیعی باشد. با توجه به وجود ماده موثره تیمول در اسانس آویشن و اوگنول در اسانس میخک مورد بررسی در این پژوهش، به نظر می رسد اثرات مهارکنندگی رشد کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا کروزبی بدلیل وجود همین ترکیب باشد. از طرفی حداقل غلظت مهار کنندگی از رشد در تیمار با اسانس میخک ایزوله های بالینی کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا کروزبی به ترتیب $7/81$ و $0/24$ شد که با توجه به این مطلب که بیشترین تاثیر ضد میکروبی ترکیبات گیاهی در غلظت های کمتر از 500 میکروگرم بر میلی لیتر است (۳۰) و با یافته های مطالعه ما نیز در یک راستا بدست آمد.

نتیجه گیری: کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا کروزبی به ترتیب از قارچ های شایع در ایجاد ولوواژینیت کاندیدایی عود کننده بودند. با توجه به یافته های این پژوهش در شرایط آزمایشگاهی اسانس های آویشن و میخک می توانند پس از بررسی های بیشتر در پیشگیری و درمان عفونت های ولوواژینیت عود کننده کاندیدایی موثر واقع شوند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش حاصل طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی زاهدان با کد کمیته اخلاق به شماره IR.ZAUMS.REC.1398.116 می باشد. از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه به جهت حمایت مالی از این طرح تقدیر و تشکر به عمل می آید.

REFERENCE

- 1- Donders G, Sziller IO, Paavonen J, Hay P, de Seta F, Bohbot JM, Kotarski J, Vives JA, Szabo B, Cepulienė R, Mendling W. Management of recurrent vulvovaginal candidosis: Narrative review of the literature and European expert panel opinion. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022;1257.
2. Sobel JD. Vulvovaginal candidiasis. *Lancet*. 2007; 1961 – 71.
3. Nazeri M, Mesdaghinia E, Moravej SAR, Atabakhshian R, Soleymani F. Prevalence of vulvovaginal candidiasis and frequency of candida species in women. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2012; 21:254-262.
4. Momenzadeh M, Talebi A, Mehri-Dehnavi A, Rabbani H. Diagnosis of vulvovaginal candidiasis via automatic extraction of candida fungus from pap smear images. *Journal of Isfahan Medical School*. 2014; 32(304):1659-67.
5. Falahati M, Fateh R, Sharifynia S, Kanani A, Memar AR, Hashem Dabbaghiyan F. Anticandidal effects of shallot extracts against chronic candidiasis agents. *Razi Journal of Medical Sciences*. 2012; 19:22-28.
6. Sohrabi H, Sarookhani MR, Ezani A. Identification of candida species associated with vulvovaginal candidiasis by comparison of an innovative molecular method with culture in 2013. *Arak Medical University Journal (AMUJ)*. 2013; 16(77):48-56.
7. Kord Z, Fata A, Zarrinfar H. Molecular identification of candida species isolated from patients with vulvovaginitis for the first time in Mashhad. *Iranian journal of obstetrics, gynecology and infertility (IJOGI)*. 2017; 20(4):50-57.
8. Eftekhari AD, Anvari M, Ranji N. Investigation of ERG11 gene mutations in fluconazole resistant candida albicans isolated from a number of Rasht hospitals. *Pathobiology Research*. 2015; 18:98-107.
9. Fathi N, Mohammadi R, Tabatabaiefar MA, Ghahri M, Sadrossadati SZ. Sequence-identification of candida species isolated from candidemia. *Advanced biomedical research*. 2016; 5.
10. Merseguel KB, Nishikaku AS, Rodrigues AM, Padovan AC, e Ferreira RC, de Azevedo Melo AS, et al. Genetic diversity of medically important and emerging candida species causing invasive infection. *BMC infectious diseases*. 2015; 15:57.
11. Ge YP, Wang L, Lu GX, Shen YN, Liu WD. A simple and reliable PCR-restriction fragment length polymorphism assay to identify candida albicans and its closely related Candida dubliniensis. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2012; 43:873-879.
12. Liguori G, Di Onofrio V, GallA F, Lucariello A, Albano L, Catania M, et al. Candida albicans identification: comparison among nine phenotypic systems and a multiplex PCR. *Journal of preventive medicine and hygiene*. 2010; 51.
13. Jensen RH, Astvad KMT, Silva LV, Sanglard D, Jørgensen R, Nielsen KF, Mathiasen EG, et al. Stepwise emergence of azole, echinocandin and amphotericin B multidrug resistance in vivo in candida albicans orchestrated by multiple genetic alterations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015; 70:2551-2555.
14. Golpour H, Ranji N, SHarami SH. Investigation of antifungal effect of nanoparticle-encapsulated curcumin on CDR1 gene expression in fluconazole-resistant isolates of candida albicans. *Journal of Microbial World*. 2017; 10(3):222-230.
15. Haghghi F, Roudbar Mohammadi S, Soleimani N, Sattari M. Evaluation of antifungal activity of essential oils of thymus vulgaris, petroselinum crispum, cuminum cyminum and bunium persicum on candida albicans in comparison with fluconazole. *Pathobiology Research*. 2011; 14(1): 29-35.
16. Mohammadi S, Ebrahimi H, Sayehmiri K. Comparison of the effect of garlic and thyme plants on candida albicans: A systematic review and meta-analysis. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2017; 26(3):38-46.

17. Dashi Pour A, Keikha N, Moodi M, Keshavarzi F, Dargahian M. Comparison of the effect of thyme and clove oil with fluconazole and nystatin on clinical isolates of candida albicans. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine (IJIDTM). 2018; 23(81):47-54.
18. Arbabi klati F, SHerzaee M, Poorzamani M, Dabiri S. Inhibitory effects of plant extracts containing thyme, clove and cinnamon compared to nystatin on candida albicans. Journal of Research in Dental Sciences. 2012; 8(4):175-179.
19. Neal CM, Martens MG. Clinical challenges in diagnosis and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. SAGE Open Medicine. 2022 Sep;10:20503121221115201.
20. Abbas Shahid, Maryam Abbas, Muhammad Raza Naqvi. The application of thyme as a medicinal plant in bacterial and fungal infections, as well as the investigation of its antinociceptive properties. September 2022; 2(3),62-67.
21. Alves M, Gonçalves MJ, Zuzarte M, Alves-Silva JM, Cavaleiro C, Cruz MT and Salgueiro L, Unveiling the Antifungal Potential of Two Iberian Thyme Essential Oils: Effect on *C. albicans* Germ Tube and Preformed Biofilms. Front. Pharmacol. May 2019; 10, 446.
22. Szweda P, Gucwa K, Kurzyk E, Romanowska E, Dzierżanowska-Fangrat K, Jurek AZ, et al. Essential oils, silver nanoparticles and propolis as alternative agents against fluconazole resistant *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida krusei* clinical isolates. Indian journal of microbiology. 2015; 55:175-183.
23. Ateke Movaghari Pour, Mahmood Sheikh Fathollahi, Mahsa Poor Zamani, Shirin Abedini, Zahra Jamali. Comparison of Anti-Fungal Effect of Origanum Vulgare Extract Versus Nystatin On *Candida Albicans*; an In Vitro Study. J Mash Dent Sch 2018; 42(3): 271-7.
24. Tran, H.N.H.; Udoh, S.; Russell, G.; Okeyoyin, O.R.; Aftab, S.; Rodriguez, I.; Tabe, E.S.; Adukwu, E.C. Recent Advances in the Application of Essential Oils as Potential Therapeutic Candidates for *Candida*-Related Infections. Appl. Microbiol. 2022, 2, 397-413.
25. Katarzyna Rajkowska, Paulina Nowicka-Krawczyk, and Alina Kunicka-Styczyńska Effect of Clove and Thyme Essential Oils on *Candida* Biofilm Formation and the Oil Distribution in Yeast Cells. May 2019; 24(10): 1954.
26. Mandras N, Nostro A, Roana J, Scalas D, Banche G, Ghisetti V, et al. Liquid and vapour-phase antifungal activities of essential oils against candida albicans and non-albicans candida. BMC complementary and alternative medicine. 2016; 16:330.
27. Satora M, Grunwald A, Zaremba B, Frankowska K, Żak K, Tarkowski R, Kułak K. Treatment of Vulvovaginal Candidiasis—An Overview of Guidelines and the Latest Treatment Methods. Journal of clinical medicine. 2023 Aug 18;12(16):5376.
28. Jazayeri M, Radi S, Abdosamadi HR, Madani Pour A, Samie L. Comparison the inhibitory effects of essential oil of thymus eriocalyx and thymus kotschyanus with nystatin on candida albicans growth-in vitro study. Journal of Mashhad Dental School. 2016; 40:133-142.
29. Zia M, Bayat M, Khalkhali H, Saffari S. Effect of thymus vulgaris, myrtus communis and nystatin on candida albicans. Journal of Gorgan University of Medical Sciences 2014; 15(4):59-65.
30. Eyres G, Dufour JP, Hallifax G, Sotheeswaran S, Marriott PJ. Identification of character impact odorants in Coriander and wild Coriander leaves using gas chromatography olfactometry (GCO) and comprehensive two dimensional gas chromatography time of flight mass spectrometry (GC×GC–TOFMS). J Sep Sci. 2005;28(9-10):1061.