

Antifungal and Synergistic Effects of Aqueous and Alcoholic Extracts of Green Tea with Itraconazole and Voriconazole on *Aspergillus* Species

Sarkhani Moghaddam F.¹ MSc, Fakoore MH.² PhD, Sabokbar A.* PhD, Ebrahimzadeh M.¹ PhD

*Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

¹Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

²Department of Microbiology, Hidaj Branch, Islamic Azad University, Hidaj, Iran.

Abstract

Aims: In this study, the replacement of natural compounds such as green tea by chemical drugs like itraconazole and voriconazole was studied.

Materials & Methods: In this study, the effects of the aqueous and methanol extracts of green tea and the synergistic effects of these two extracts were studied along with two drugs of itraconazole and voriconazole against four strains of *Aspergillus* according to microdilution method to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC).

Findings: Two strains of *A.flavus* ATCC₃₉ and *A.terreus* ATCC₂₇₄ are sensitive to itraconazole while two other strains were resistant. All four tested strains were resistant to voriconazole. The aqueous and methanol extracts of green tea did not show antifungal effect but synergistic effects of aqueous extract of green tea and itraconazole were worthwhile against *A.niger* ATCC₉₁₄₂ and *A.fumigatus* ATCC₂₇₈. Also, the combined methanol extracts of green tea and itraconazole against *A.niger* ATCC₉₁₄₂ and the combined aqueous extracts of green tea and voriconazole against *A.flavus* ATCC 39 and *A.fumigatus* ATCC₂₇₈ were reported valuable.

Conclusion: The results of this study showed that there is a valuable synergistic effect between the tested antifungal drugs and the extracts.

Keywords:

Green Tea [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=Green+tea>];

Itraconazole [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68017964>];

Voriconazole [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=Voriconazole>];

Aspergillus [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68001230>];

* Corresponding Author

Tel: +98(026)32773730

Fax: +98(026)32773730

Address: Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

azar.sabokbar2017@gmail.com

Received: 18 May 2018

Accepted: 23 May 2018

ePublished: 23 Jan 2018

اثرات ضد قارچی و هم‌افزایی عصاره‌های آبی و الکلی چای سبز با داروهای ایتراکونازول و وریکونازول بر روی گونه‌های آسپرژیلوس

فرنوش سرخانی مقدم MSc

گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

محمد هادی فکور PhD

گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، هیدج، ایران.

آذر سیک‌بار* PhD

گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

مهديس ابراهيم زاده PhD

گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

چکیده

اهداف: در این مطالعه، جایگزینی ترکیبات طبیعی مانند چای سبز بجای استفاده از داروهای شیمیایی ایتراکونازول و وریکونازول بررسی شد. **مواد و روش‌ها:** در این پژوهش میزان اثرات ضد قارچی عصاره‌های آبی و متانولی چای سبز و همچنین اثرات هم‌افزایی این دو عصاره با دو داروی ایتراکونازول و وریکونازول بر روی چهار سویه آسپرژیلوس مطابق روش رقت در پلیت الایزا با تعیین حداقل غلظت مهاري و حداقل غلظت قارچ کشی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: دوسویه آسپرژیلوس فلاووس ATCC 39 و آسپرژیلوس ترئوس ATCC 274 نسبت به داروی ایتراکونازول حساس و دوسویه دیگر مقاوم بودند. تمامی ۴ سویه مورد بررسی نسبت به وریکونازول مقاوم بودند. دو عصاره آبی و متانولی چای سبز، اثر ضد قارچی از خود نشان ندادند اما اثرات هم‌افزایی در ترکیب عصاره آبی چای سبز و ایتراکونازول در دو سویه آسپرژیلوس فومیگاتوس ATCC278 و آسپرژیلوس نایجر ATCC9142 ارزشمند بود و همچنین دو ترکیب عصاره متانولی چای سبز و ایتراکونازول در آسپرژیلوس نایجر ATCC9142 و دو ترکیب عصاره آبی چای سبز و وریکونازول بر روی آسپرژیلوس فلاووس ATCC 39 و آسپرژیلوس فومیگاتوس ATCC278 ارزشمند گزارش شد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این پژوهش بیانگر وجود اثرات هم‌افزایی ارزشمندی بین ترکیبات داروها و عصاره‌های مورد آزمایش بود.

کلیدواژه‌ها: چای سبز، ایتراکونازول، وریکونازول، آسپرژیلوس.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۳/۰۲

*نویسنده مسئول: azar.sabokbar2017@gmail.com

مقدمه

گونه‌های آسپرژیلوس دسته‌ای از قارچ‌های رشته‌ای هستند که عموماً در خاک، سبزیجات در حال فساد و دانه‌ها به‌عنوان قارچ‌های ساپروفیت رشد می‌کنند. آسپرژیلوس‌ها گهگاه می‌توانند برای سلامتی انسان مضر باشند. در بین ۲۰۰ گونه شناخته‌شده از آسپرژیلوس‌ها فقط تعداد کمی از آن‌ها می‌توانند باعث بیماری‌های عفونی در انسان شوند [1].

از بین گونه‌های آسپرژیلوس ۵ گونه مهم آن شامل آسپرژیلوس فومیگاتوس، آسپرژیلوس ترئوس، آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس نایجر و آسپرژیلوس نیدولانس می‌باشند که در این بین، اولین و مهم‌ترین گونه بیماری‌زای آن آسپرژیلوس فومیگاتوس می‌باشد. کونیدی‌های آسپرژیلوس‌ها در هوا پراکنده بوده و با توجه به سیستم ایمنی افراد، طیف وسیعی از بیماری‌ها را می‌توانند ایجاد کنند شامل: ایجاد عفونت در بیماران مبتلا به آسم و سیستمیک فایبروز،

آسپرژیلوس می‌تواند باعث بیماری‌های ریوی و هم‌افزایی چای سبز بر روی گونه‌های آسپرژیلوس ۲۲۴

آسپرژیلوس‌ها نسبت به داروهای ضد قارچی گروه تری‌آزول‌ها شامل ایتراکونازول و وریکونازول حساس می‌باشند ولی اخیراً مقاومت برخی گونه‌ها به‌ویژه آسپرژیلوس فومیگاتوس نسبت به این گروه از داروها مشاهده شده است. مطالعات نشان داده است، علت این مقاومت دارویی، ایجاد یک

موتاسیون نقطه‌ای در ژن سیتوکروم P₅₁A می‌باشد که مانع سنتز ارگوسترول می‌شود [3,4]. بنابراین چنین مقاومت‌هایی که در برخی آسپرژیلوس‌ها نسبت به داروهای گروه آزول‌ها مشاهده شده است، و از طرفی عوارض جانبی که مصرف داروهای شیمیایی می‌توانند در بدن ایجاد کنند، ضرورت

نیاز به یکسری ترکیبات ضد قارچی جدید مانند گیاهان دارویی شامل چای سبز را دوجندان کرده است. چای سبز محبوب‌ترین نوشیدنی در سرتاسر جهان است که از برگ‌های گیاهی بانام علمی *Camellia sinensis* گرفته شده است. چای سبز دارای ترکیباتی مانند پلی فنول‌ها و آلکالوئیدها شامل:

فلاوونول‌ها، فلاوونوئیدها، و فنولیک اسیدها هستند. چلی فنول‌ها با نام عمومی کاتچین‌ها، بیشترین ترکیبات موجود در برگ‌های چای سبز هستند که تقریباً ۳۰٪ وزن خشک چای سبز را تشکیل می‌دهند [5]. کاتچین‌های موجود در چای سبز دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی به علت حضور ترکیباتی

مانند کاتچین (C)، اپی کاتچین (EC)، اپی گالوکاتچین (EGC)، اپی کاتچین ۳ گالاته (ECG) و اپی گالوکاتچین ۳ گالاته (EGCG) می‌باشند. پلی فنول‌های موجود در چای سبز شامل

یکی از قدرتمندترین پلی فنول‌های آنتی‌اکسیدان موجود در چای سبز EGCG (اپی گالوکاتچین گالات) می‌باشد که دارای خواص پزشکی بوده و برای درمان بسیاری از بیماری‌ها از آن استفاده می‌شود. همچنین چای سبز دارای مقدار کمی املاح معدنی می‌باشد که برای سلامتی مهم است. چای سبز

می‌تواند در کوتاه‌مدت متابولیسم را افزایش داده و این‌گونه می‌تواند به کاهش وزن کمک کند. پلی فنول‌های چای سبز می‌تواند با کاهش رشد باکتری‌ها، خطر ابتلا به عفونت‌ها را کاهش دهد. همچنین می‌تواند به سلامت دهان و دندان کمک کرده و خطر پوسیدگی دندان را کاهش دهد [6].

پلی فنول‌های چای سبز، تشکیل رادیکال‌های آزاد موجود در بدن را کاهش داده و این‌چنین بدن را در برابر بیماری‌هایی مانند آترواسکلروزیس، بیماری‌های قلبی-عروقی و سرطان‌ها محافظت می‌کند [7]. همچنین در چندین مطالعه، پلی فنول‌های چای سبز اثرات بسیار ویژه‌ای را علیه بسیاری از میکروارگانیسم‌ها شامل: کوکسی‌های گرم مثبت و باسیل‌های گرم منفی مانند: اشرشیا کلی، گونه‌های سالمونلا، استافیلوکوکوس اورئوس و گونه‌های انتروکوکوس و علیه برخی از قارچ‌های بیماری‌زا مانند: کاندیدا آلبیکنس و برخی از ویروس‌های مهم بیماری‌زا مانند: HIV، HSV و ویروس آنفلانزا از خود نشان دادند. مطالعات چرپوت و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان داد که، عصاره ریشه چای سبز دارای

۱) آسپرژیلوس فلاووس (= ۷۸-۸۲٪) آسپرژیلوس فومیگاتوس = ۸۰-۸۲٪ (۳ آسپرژیلوس نایجر = ۸۰-۸۲٪) آسپرژیلوس ترئوس = ۸۰-۸۲٪

زمانی که جذب نوری هرکدام از سوش های قارچی موردنظر در محدوده مناسب قرار گرفت، در این حالت هرکدام از سوسپانسیون ها حاوی ۱۰۶ اسپور بر میلی لیتر از قارچ موردنظر بوده است. محیط کشت RPMI₁₆₄₀ استریل حاوی MOPS جهت تهیه سوسپانسیون اسپور قارچی مدنظر بود و رقت اسپور مطابق CLSI A2-38 برابر ۱۰^۴ اسپور بر میلی لیتر تهیه شد.

استوک داروهای ایتروکونازول و وریکونازول: به جهت تهیه استوک دارویی مقدار ۰/۰۰۳۲ گرم ایتروکونازول و وریکونازول برحسب گرم مطابق فرمول زیر را با ۵ میلی لیتر از DMSO خالص به عنوان حلال داروها و همچنین رفع آلودگی های احتمالی باهم ترکیب شد. غلظت اولیه داروها ۱۶ میکروگرم بر میلی لیتر بود. ترکیب را ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده تا داروها به طور کامل در DMSO حل شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول حاصل را درون لوله آزمایش استریل ریخته و مقدار ۹۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI₁₆₄₀ حاوی MOPS استریل به آن اضافه شد.

غلظت داروهای مورد استفاده درون اولین چاهک میکروپلیت الیزا ۰/۱ رقیق شده و معادل ۶۴ میکروگرم بر میلی لیتر بود مابقی چاهک ها به صورت سریال رقت معادل ۱۶، ۸، ۴، ۲، ۱، ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر لحاظ شد. رقت دارو توسط محیط کشت RPMI₁₆₄₀ حاوی MOPS استریل انجام شد [11].

غلظت برحسب میکروگرم بر میلی لیتر ۱۶×۴۰=۶۴۰ (ضریب رقت مطابق CLSI) × غلظت اولیه دارو : غلظت دارو

$$\frac{5 \times 640}{100 \times 10} = 0/0032gr$$

$\frac{\mu g}{mL} \times \text{غلظت دارو} (mL) \times \text{حجم حلال} (mg) = \text{Assay potency} (\mu g) \times 10$

عصاره های آبی و متانولی برگ چای سبز: جهت تهیه عصاره های آبی و متانولی برگ های چای سبز، برگ های خشک شده این گیاه که حاصل کشت تازه سال ۹۴ و محصول کارخانه تولید چای دامنه لاهیجان بود به روش خیساندن عصاره گیری شد. ابتدا ۱۰۰ گرم از گیاه خرد شده را درون دکانتور ریخته و ۳۰۰ میلی لیتر از هر حلال یعنی آب برای عصاره آبی و متانول برای عصاره متانولی به آن اضافه شد بطوریکه حلال کاملاً سطح گیاه را پوشاند. جهت جلوگیری از تابش مستقیم نور خورشید و جلوگیری از تغییرات، عصاره گیری در منطقه ای دور از نور انجام شده و جهت جلوگیری از تبخیر حلال درب ظرف عصاره گیری محکم بسته شد. عمل عصاره گیری را ضمن تکان دادن و هم زدن مکرر به مدت ۵-۲ روز در حرارت اتاق انجام شد. سپس عصاره ها صاف شده و برای خروج حلال از آن ها عصاره ها به مدت ۷-۵ روز در دمای محیط نگهداری شدند. سپس عصاره های حاصل، درون لوله فالکون های ۱۵ میلی لیتری ریخته و با استفاده از دستگاه لیوفلیزاسیون (دانشکده قارچ شناسی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس) در دمای ۳۰- و طی مدت ۲ روز، به پودر عصاره های

خواص ضد قارچی علیه گونه های کاندیدا شامل: کاندیدا تروپیکالیس ATCC₇₅₀، کاندیدا فاماتا، کاندیدا لوسیتانیا و گونه های درماتوفیت ها شامل تریکوفایتون منتاگروفایتیس می باشد. کاندیدا آلیکنس و کریپتوکوکوس نئوفورمنس نسبت به عصاره ریشه چای سبز حساسیت نشان دادند [8]. در پژوهشی دیگر نتایج حاصل از مطالعات جیگشا و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان داد که، عصاره های متانولی و استونی چای سبز دارای خواص آنتی باکتریال هستند. همچنین در ترکیب عصاره متانولی چای سبز با داروی آمپی سیلین بر روی دو باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا اثرات هم افزایی مشاهده شد، به گونه ای که قطر هاله عدم رشد علیه استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب از ۳۶ ± ۰/۰۷ به ۳۹ ± ۱/۴۱۴ میلی متر و ۲۶ ± ۰/۰۷ به ۲۹ ± ۰/۰۷ بعد از ترکیب دارو و عصاره افزایش یافت [9].

مادهورا و همکاران در سال ۲۰۱۶، اثرات ضد قارچی عصاره چای سبز بر روی قارچ های گونه کاندیدا به روش t-test در مقایسه با گروه شاهد اثبات کردند [10]. لذا تاکنون مطالعاتی انجام پیرامون اثر ضد قارچی عصاره آبی و متانولی چای سبز به ویژه چای سبز ایرانی بر روی گونه های آسپرژیلوس صورت نپذیرفته و از طرفی تا به حال پژوهشی مبنی بر بررسی اثرات هم افزایی حاصل از ترکیب عصاره های آبی و متانولی چای سبز با دو داروی ایتراکونازول و وریکونازول صورت نگرفته است. لذا در این پژوهش هدف ارزیابی فعالیت ضد قارچی عصاره آبی و متانولی چای سبز دامنه محصول شهر لاهیجان بر روی ۴ سویه آسپرژیلوس موردنظر شامل آسپرژیلوس فلاووس ATCC₃₉، آسپرژیلوس فومیگاتوس ATCC₂₇₈، آسپرژیلوس ترئوس ATCC₂₇₄ و آسپرژیلوس نایجر ATCC₉₁₄₂ و بررسی اثرات هم افزایی این دو عصاره در ترکیب با ایتراکونازول و وریکونازول بود.

مواد و روش ها

میکروارگانیزم ها و محیط کشت: چهار سویه آسپرژیلوس شامل آسپرژیلوس فلاووس ATCC₃₉، آسپرژیلوس فومیگاتوس ATCC₂₇₈، آسپرژیلوس نایجر ATCC₉₁₄₂ و آسپرژیلوس ترئوس ATCC₂₇₄ از بخش قارچ شناسی دانشکده علوم پزشکی مازندران و دانشگاه علوم پایه شاهد تهیه و جهت کشت و انجام بررسی های موردنظر به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد کرج منتقل شد. محیط های کشت سابوردکستروز آگار و RPMI₁₆₄₀ مربوط به شرکت (Merck co, Germany) بود.

تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ: جهت تهیه هر یک از سوسپانسیون های اسپور قارچ، مطابق پروتکل CLSI A2-38 سال ۲۰۱۲ انجام شد. پس از کشت قارچ موردنظر در اسلنت شیب دار سابوردکستروز آگار به مدت ۲ هفته، برداشت اسپور توسط آب مقطر استریل و توئین ۸۰ (Merck co, Germany) انجام و شیک شد. طول موج شمارش سوسپانسیون اسپور قارچ ۵۳۰ نانومتر و محدوده جذب نوری برای ۴ سویه آسپرژیلوس موردنظر به شرح زیر بود:

۱۰۰ میکرولیتر داروی ایتراکونازول لحاظ شد. درون چاهک دیگر به‌عنوان شاهد مثبت، ۱۰۰ میکرولیتر RPMI₁₆₄₀ حاوی MOPS استریل و سوسپانسیون قارچی و همچنین یک چاهک دیگر نیز به‌عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد که دارای ۱۰۰ میکرولیتر (۵٪) DMSO و ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون قارچی بود و نشان از عدم مهارکنندگی رشد اسپور توسط (۵٪) DMSO می‌باشد. میکروپلیت‌ها را به مدت ۳ تا ۵ روز درون انکوباتور ۳۵ قرار داده و از طریق مشاهده چشمی، کدورت چاهک‌ها را از نظر رشد کلنی‌های قارچ و تعیین حداقل غلظت مهارتی بررسی شد. حداقل غلظت مهارتی سایر داروها و عصاره‌ها شامل ایتراکونازول، عصاره آبی چای سبز، عصاره متانولی چای سبز، و ترکیب دویه‌دوی داروها و عصاره‌ها به همین روش بررسی شد [13].

حداقل غلظت قارچ کشی از هرکدام از چاهک‌ها که در آن رشد کلنی قارچی مشاهده شده بود و دو چاهک قبل از آن به کمک سوآب استریل به روش کشت چمنی بر روی محیط سابوردکستروز آگار کشت داده شد و سپس پلیت‌ها را درون انکوباتور ۳۵ به مدت ۳-۵ روز قرار داده و بعد از گذشت مدت‌زمان موردنظر تعداد کلنی‌های هر پلیت را موردبررسی قرار می‌گرفت. هر پلیت که در آن کمتر از ۴ پرگنه قارچی مشاهده شد به‌عنوان حداقل غلظت قارچ کشی لحاظ شد [14,15,16].

بررسی‌های آماری: در این تحقیق، حداقل غلظت‌های مهارتی و قارچ کشی داروها و عصاره‌ها و ترکیبات آن‌ها از طریق مشاهده چشمی بعد از ۵ بار تکرار تعیین و سپس با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۰، تست چند دامنه‌ای دانکن برای داده‌های حاصل انجام شد.

یافته‌ها

داروی ایتراکونازول در مقایسه با داروی وریکونازول در نتیجه هم‌افزایی با عصاره‌های آبی و متانولی چای سبز، دارای نتایجی مؤثر و مطلوب بود. این در حالیست که اثر هم‌افزایی وریکونازول با عصاره‌های یادشده به استثنای قارچ فومیگاتوس عمدتاً فاقد ارزش بودند. بررسی‌ها بیانگر این بود که عصاره‌های آبی و متانولی چای سبز با نام دامنه محصول لاهیجان به‌تنهایی هیچ‌گونه اثر ضد قارچی بر روی سویه‌های آسپرژیلوس موردنظر نداشتند. نتایج حداقل غلظت مهارتی نشان‌دهنده وجود اثرات هم‌افزایی در ترکیباتی مانند ترکیب عصاره آبی چای سبز و داروی ایتراکونازول بر روی آسپرژیلوس فومیگاتوس ATCC₂₇₇₈ با حداقل غلظت مهارتی ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. این در حالی است که حداقل غلظت مهارتی برای داروی ایتراکونازول به‌تنهایی ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای قارچ یادشده گزارش شده بود (جدول شماره ۱). حداقل غلظت مهارتی در ترکیب هم‌افزایی عصاره آبی چای سبز و ایتراکونازول در آسپرژیلوس نایجر ATCC₂₇₇₈ با ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای داروی ایتراکونازول به‌تنهایی گزارش شد. همچنین در ترکیب هم‌افزایی

آبی و متانولی چای سبز تبدیل شده و جهت انجام کار به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج منتقل شدند و در طول مدت استفاده درون فریزر ۲۰- نگهداری گردیدند [12].

تهیه استوک عصاره‌های آبی و متانولی چای سبز: جهت بررسی تأثیر ضد قارچی عصاره‌های آبی و متانولی چای سبز محاسبات به‌گونه‌ای انجام شد که غلظت هرکدام از عصاره‌ها معادل ۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر در چاهک اول و رقت‌های بعدی درون چاهک‌های میکروپلیت از چپ به راست ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر در چاهک‌های دوم تا آخر شد. برای این کار مطابق پروتکل CLSI A2 غلظت چاهک اول را ۴۰ برابر در نظر گرفته و سپس برای محاسبه وزن مقدار پودر عصاره‌های مورد استفاده، از فرمول زیر استفاده شد:

میکروگرم بر میلی‌لیتر $128 \times 40 = 5120$

$$\text{وزن (mg)} = \frac{\text{غلظت دارو} \times \text{حجم حلال}}{\text{Assay potency} \times 100} = \frac{5 \times 5120}{100 \times 10} = 0.25 \text{ gr}$$

سپس مقدار ۰/۲۵ گرم از هرکدام از عصاره‌ها را وزن کرده و سایر مراحل مشابه ساخت استوک دو داروی ایتراکونازول و وریکونازول یکسان بود. در نهایت غلظت عصاره‌ها در چاهک اول معادل ۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر شدند [11].

تهیه استوک ترکیب داروها و عصاره‌های باهم برای بررسی اثرات هم‌افزایی آن‌ها: جهت تهیه استوک ترکیب داروها و عصاره‌ها باهم تمامی مراحل مشابه تهیه استوک عصاره‌های آبی و متانولی انجام شد با این تفاوت که نصف مقدار وزنی داروها یا پودر عصاره‌های مورد آزمایش قرار گرفت (۰/۱۲۵ gr = ۲۰/۲۵۰). به عبارتی مقدار ۰/۱۲۵ gr از هرکدام از داروها و ۰/۱۲۵ gr از هرکدام از عصاره‌ها وزن شده و به ترتیب مخلوط شده و سایر مراحل مطابق تهیه استوک عصاره‌های آبی و متانولی انجام گرفت [11].

بررسی خاصیت ضد قارچی: بررسی‌ها برای تعیین حداقل غلظت مهارتی داروها، عصاره‌ها و ترکیب آن‌ها برای بررسی اثر هم‌افزایی داروها و عصاره‌ها باهم مطابق پروتکل CLSI A2-38 به روش رقیق‌سازی درون میکروپلیت‌های ۹۶ خانه الیزا انجام گرفت.

برای این منظور برای تعیین حداقل غلظت مهارتی داروی ایتراکونازول به این صورت عمل شد که در شرایط کاملاً استریل، در تمامی چاهک‌های میکروپلیت به‌جز شاهد، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر RPMI₁₆₄₀ حاوی MOPS استریل ریخته شد، سپس به چاهک اول ۱۰۰ ml از استوک داروی ایتراکونازول اضافه شد و در مرحله بعد، ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته و تا چاهک آخر رقت‌سازی انجام گرفت و از چاهک آخر ۱۰۰ میکرولیتر دور ریخته شد. به‌تمامی چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون قارچی با غلظت ۱۰۴ افزوده شد. برای بررسی دقیق نتیجه کار، یک چاهک را به‌عنوان شاهد منفی که شامل ۱۰۰ میکرولیتر RPMI₁₆₄₀ حاوی MOPS استریل و

بر میلی‌لیتر داروی ایتراکونازول به‌تنهایی در این قارچ گزارش شد (جدول شماره ۱).

عصاره متانولی چای سبز و ایتراکونازول در آسپرژیلوس نایجر ATCC₉₁₄₂ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با ۱۶ میکروگرم

جدول (۱) حداقل غلظت مهارى حاصل از اثر داروها و عصاره‌ها و ترکیب آن‌ها بر روی قارچ‌های مورد آزمایش

ترکیب عصاره متانولی چای سبز و وریکونازول	ترکیب عصاره آبی چای سبز و وریکونازول	ترکیب عصاره متانولی چای سبز و ایتراکونازول	ترکیب عصاره آبی چای سبز و ایتراکونازول	عصاره متانولی چای سبز	عصاره آبی چای سبز	وریکونازول	ایتراکونازول	عصاره و دارو سوبه قارچی
۶۴±۲	۸±۰/۱	۴±۰/۰۲	۴±۰/۰۱	±۰	±۰	۱۶±۰/۱	۰/۵±۰/۰۵	آسپرژیلوس فلاووس ۳۹
۶۴±۱	۴±۰/۰۱	۱۶±۱	۴±۰/۰۲	±۰	±۰	۸±۰/۲	۸±۰/۰۵	آسپرژیلوس فومیگاتوس ۲۷۸
۳۲±۰/۵	۱۶±۰/۱	۴±۰/۵	۱۶±۰/۱	±۰	±۰	۸±۰/۰۱	۰/۵±۰/۰۵	آسپرژیلوس ترئوس ۲۷۴
۱۲۸±۲	۳۲±۰/۵	۴±۰/۲	۴±۰/۰۱	±۰	±۰	۴±۰/۰۲	۱۶±۰/۱	آسپرژیلوس نایجر

اعداد میانگین سه تکرار به صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشد. مقادیری که در هر ستون نشان داده شده است در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ می‌باشند. واحد هرکدام از مقادیر میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد.

ترکیب عصاره آبی چای سبز و وریکونازول در آسپرژیلوس فلاووس ATCC₃₉ با حداقل غلظت قارچ کشی ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر در آسپرژیلوس فومیگاتوس ATCC₂₇₈ و ایتراکونازول در این قارچ و در نهایت در ترکیب عصاره آبی چای سبز و وریکونازول در آسپرژیلوس فومیگاتوس ATCC₂₇₈ با ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر داروی وریکونازول در این قارچ بود. از سوی دیگر نتایج حاصل نشان داد که بر اساس پروتکل GLSI دو سوش آسپرژیلوس فلاووس ATCC₃₉ و آسپرژیلوس ترئوس با ATCC₂₇₄ هر دو با ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به داروی ایتراکونازول حساس و سوبه آسپرژیلوس فومیگاتوس

ترکیب عصاره آبی چای سبز و وریکونازول در آسپرژیلوس فلاووس ATCC₃₉ با حداقل غلظت قارچ کشی ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر در آسپرژیلوس فومیگاتوس ATCC₂₇₈ و ایتراکونازول در این قارچ و در نهایت در ترکیب عصاره آبی چای سبز و وریکونازول در آسپرژیلوس فومیگاتوس ATCC₂₇₈ با ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر داروی وریکونازول در این قارچ بود. از سوی دیگر نتایج حاصل نشان داد که بر اساس پروتکل GLSI دو سوش آسپرژیلوس فلاووس ATCC₃₉ و آسپرژیلوس ترئوس با ATCC₂₇₄ هر دو با ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به داروی ایتراکونازول حساس و سوبه آسپرژیلوس فومیگاتوس

جدول (۲) حداقل غلظت قارچ کشی حاصل از اثر داروها و عصاره‌ها و ترکیب آن‌ها بر روی قارچ‌های مورد آزمایش

ترکیب عصاره متانولی چای سبز و وریکونازول	ترکیب عصاره آبی چای سبز و وریکونازول	ترکیب عصاره متانولی چای سبز و ایتراکونازول	ترکیب عصاره آبی چای سبز و ایتراکونازول	عصاره متانولی چای سبز	عصاره آبی چای سبز	وریکونازول	ایتراکونازول	عصاره و دارو سوبه قارچی
۶۴±۲	۱۶±۰/۱	۴±۰/۰۲	۴±۰/۰۱	±۰	±۰	۱۶±۰/۱	۱±۰/۰۵	آسپرژیلوس فلاووس ۳۹
۶۴±۱	۴±۰/۰۱	۱۶±۰/۵	۴±۰/۰۲	±۰	±۰	۸±۰/۲	۱۶±۰/۰۵	آسپرژیلوس فومیگاتوس ۲۷۸
۳۲±۰/۵	۱۶±۰/۱	۴±۰/۵	۱۶±۰/۱	±۰	±۰	۱۶±۰/۰۱	۱±۰/۰۵	آسپرژیلوس ترئوس ۲۷۴
۱۲۸±۲	۳۲±۰/۵	۴±۰/۲	۴±۰/۰۱	±۰	±۰	۸±۰/۰۲	۱۶±۰/۱	آسپرژیلوس نایجر

اعداد میانگین سه تکرار به صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشد. مقادیری که در هر ستون نشان داده شده است در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ می‌باشند. واحد هرکدام از مقادیر میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد.

بحث

دارای نقص ایمنی ایجاد نمایند^[17]. تری آزول‌هایی مانند ایتراکونازول، وریکونازول و پوساکونازول برای درمان عفونت‌های مزمن و مهاجم ناشی از آسپرژیلوس‌ها شامل: آسپرژیلویزیس و آسپرژیلوما مورد استفاده قرار می‌گیرند، اما چالشی که وجود دارد این است که اخیراً مطالعات نشان داده‌اند که، مقاومت‌هایی نسبت به گروه تری آزول‌ها در

آسپرژیلوس‌ها از جمله قارچ‌های ساپروفیتی می‌باشند که با ایجاد متابولیت‌های ثانویه و یا مایکوتوکسین‌هایی مانند آفلاتوکسین، می‌توانند بر سلامتی انسان مخاطره آفرین بوده و انواع مختلفی از عفونت‌ها، از آسم گرفته تا عفونت‌های منتشر خطرناک را، به‌خصوص در افراد

نائینی و همکاران در سال ۲۰۱۷ مطالعاتی را مبنی بر بررسی اثر ضد قارچی عصاره آبی چای سبز بر روی گونه‌های مختلف کاندیدا شامل: کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا کروزه ای و کاندیدا تروپیکالیس به روش punch-hole method انجام دادند. در این پژوهش عصاره آبی چای سبز بر گونه‌های کاندیدای مورد آزمایش بی‌اثر (با قطر هاله عدم شد) شناسایی شد^[21]. تمام موارد فوق صحت پژوهش انجام‌شده را تأیید می‌کند. اما آنچه باعث مزیت و برتری پژوهش انجام‌شده است بررسی اثرات هم‌افزایی حاصل از ترکیب دو داروی ایتراکونازول و وریکونازول با دو عصاره آبی و متانولی چای سبز می‌باشد که برای اولین بار مورد پژوهش قرار گرفته است. نویسندگان مقاله نظر دارند که با توجه به گسترش مقاومت‌های دارویی و ناگزیری پژوهشگران به جایگزینی مناسب جهت هم‌افزایی ترکیبات طبیعی با داروهای شیمیایی می‌شود معضل مقاومت دارویی و اثرات منفی پیامدهای داروهای شیمیایی را باهم کاهش دهند. همچنین با توجه به اینکه چای سبز *Camelia Sinesis L* از خشک کردن برگ‌های تازه چای حاصل می‌شود. این گیاه حاوی ترکیبات پلی فنولیک شامل اپی گالوکاتشین -۳- گالات (Epigallocatechin-3-gallate-EGCG)، اپی گالوکاتشین (Epigallocatechin-EGC)، اپی کاتشین (Epicatechin-EC) و اپی کاتشین گالا (Epicatechin3-gallate (ECG) است^[22] و با توجه به این نکته دنیا به سمت تحقیقات عمیق پیرامون اجزاء چای سبز پیش رفته است. آقای پارک و همکاران در سال ۲۰۱۱ به بررسی اثر ضد قارچی اپی گالوکاتشین گالات موجود در چای سبز بر روی گونه‌های درماتوفیت شامل تریکوفاتیون روبروم و تریکوفاتیون مفتاگروفاستین پرداختند. در این پژوهش هر دوی این قارچها نسبت به اپی گالوکاتشین گالات حساس و دارای محدوده MIC_۰ = ۲-۴ میکروگرم بر میلی لیتر و MIC_{۹۰} = ۴-۸ میکروگرم بر میلی لیتر بودند^[23] و همچنین آبراهام و همکاران به بررسی اثر هم‌افزایی بین عصاره متانولی چای سبز با آنتی بیوتیک کلرامفنیکل با روش دیسک در پلیت و بررسی قطر هاله عدم رشد پرداختند و نتایج به دست آمده حاصل از این اثر هم‌افزایی به این صورت بود که برای اشرشیا کلی ۱۶ میلی‌متر، انتروکوکوس فکالیس ۲۴ میلی‌متر، سالمونلا تیفی ۱۲ میلی‌متر، استافیلوکوکوس اورئوس ۶ میلی‌متر، سودوموناس آئروژینوزا ۱۰ میلی‌متر بود و بر روی آسپرژیلوس نایجر، کاندیدا آلیکس، فوزاریوم و ویبریو کلرا بی‌اثر بودند^[24]. لذا پیشنهاد می‌شود جهت شناسایی و بررسی خواص ضد میکروبی و ضد قارچی اجزاء ترکیبات مؤثر چای سبز ایران خصوصاً بر روی ترکیباتی که بیشترین درصد را در چای سبز دارا هستند، تحقیق شود. گسترش بررسی بر روی تعداد بیشتری سویه‌های آسپرژیلوس خصوصاً آسپرژیلوس‌های جداسازی شده از بیماران بستری بررسی شود و ساختار شیمیایی داروها و همچنین ترکیبات

برخی گونه‌های آسپرژیلوس مثل آسپرژیلوس فومیگاتوس، آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس ترئوس و آسپرژیلوس فلاووس، مشاهده شده است^[18].

به جهت برطرف کردن این چالش استفاده از گیاهان دارویی مانند چای سبز پیشنهاد می‌شود. چای سبز دارای ترکیباتی به نام پلی فنول‌ها می‌باشد که حدود ۹۰-۸۰٪ فلاونوئیدهای موجود در چای سبز و ۴۰-۳۰٪ وزن خشک چای سبز را تشکیل می‌دهند و مهم‌ترین ترکیب پلی فنولی آن EGCG (اپی گالوکاتچین-۳-گالات) می‌باشد که این ترکیبات در بدن انسان دارای خواص ضد سرطان، پیشگیری‌کننده و کاهش‌دهنده بیماری‌های قلبی-عروقی، ضد التهاب و همچنین خواص ضد میکروبی علیه باکتری‌ها، ویروس‌ها، انگل‌ها و قارچ‌های مختلف می‌باشد. خواص ضد باکتریایی آن علیه باکتری‌هایی مانند: اشرشیا کلی، سالمونلا تیفی، سودوموناس آئروژینوزا، هلیکوباکتر پیلوری، پروتئوس میرابیلیس، لیستریا مونوسایتوز، باسیلوس سرئوس، سالمونلا تیفی موریوم، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، یرسینیا انتروکولیتیکا، ویبریو کلرا، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس پایوژنز، پرووتلا اینترمدیا، خواص ضد ویروسی آن علیه ویروس‌هایی مانند: ایشیتین بار ویروس (EBV)، هپاتیت B و HIV1 و هپاتیت C هرپس سیمپلکس ویروس ۱ (HSV1)، آنفولانزا تیپ A H5N2, H3N2, H1N1 و آنفولانزا تیپ B. خواص ضد انگلی آن علیه انگلی مانند: تریپانوزوما کروزلی و خواص ضد قارچی آن علیه قارچ‌هایی مانند: گونه‌های اکتینومایسس، آسپرژیلوس نایجر و کاندیدا آلبیکنس می‌باشد^[19]. هارامین و همکاران مطالعاتی را مبنی بر بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های متانولی و آبی چای سبز چینی به روش انتشار در آگار، بر روی یک باکتری گرم مثبت مانند: استافیلوکوکوس اورئوس و پنج باکتری گرم منفی مانند: اشرشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه، پروتئوس ولگاریس، سودوموناس آئروژینوزا و سالمونلا تیفی و همچنین دو قارچ استاندارد آسپرژیلوس نایجر و کاندیدا آلبیکنس انجام دادند. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که، عصاره متانولی برگ چای سبز اثرات ضد قارچی فراوانی را (۲۴ تا ۲۸ میلی‌متر) علیه تمام باکتری‌های مورد بررسی از خود نشان داد. عصاره آبی چای سبز اثر ضد قارچی متوسطی را علیه اشرشیا کلی (۱۶ میلی‌متر) نشان داد و بر باکتری‌های گرم مثبت و تمام باکتری‌های گرم منفی تست بی‌اثر بود. هر دو عصاره‌های آبی و متانولی چای سبز بر دو قارچ مورد آزمایش شامل کاندیدا آلبیکنس و آسپرژیلوس نایجر بی‌اثر بودند، نتایج این پژوهش در مورد بی‌اثر بودن عصاره‌های آبی و متانولی چای سبز بر آسپرژیلوس نایجر با نتیجه پژوهش ما که در آن هر دو عصاره آبی و متانولی چای سبز بر تمام سویه‌های قارچی از جمله آسپرژیلوس نایجر بی‌اثر بودند، مطابقت دارد^[20].

دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج (استاد راهنما در پروژه پایان نامه)، مهدیس ابراهیم زاده (نویسنده چهارم) استادیار و عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج (استاد مشاور در پروژه پایان نامه) می باشند.

منابع مالی: کلیه منابع مالی متعلق به پایان نامه دانشجویی سرکار خانم فنوش سرخانی مقدم می باشد که مطابق با بخشنامه های دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج تأمین شده است.

منابع

- 1- Mousavi B, Hedayati MT, Hedayati N, Ilkit M, Syedmousavi S. *Aspergillus* species in indoor environments and their possible occupational and public health hazards. *Curr Med Mycol*. 2016;2(1): 6-42.
- 2- Lamoth F. *Aspergillus fumigatus*-related species in clinical practice. *Front. Microbiol*. 2016;7(683):1-8.
- 3- Van Der Linden JW, Arendrup MC, Warris A, Lagrou K, Pelloux H, Hauser PM, et al. Prospective multicenter international surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Emerg. Infect*; 2015;21(6):1041-44.
- 4- Lazzarini C, Camela Esposto M, Prigitano A, et al. Azole resistance in *aspergillus fumigatus* clinical isolates from an Italian culture collection. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2016;60(1):682-5.
- 5- Zia Ud Den N, Shahid M. Determination of bioactive properties of different temperature *camellia sinensis* (Green Tea). *Am. J. Food Nutr*. 2017;5(1):10-8.
- 6- Farhad Mollashahi N, Bokaeian M, Farhad Mollashahi L, Afrougheh A. Antifungal efficacy of green tea extract against *candida albicans* biofilm on tooth substrate. *J Dent*. 2015;12(8):592-8.
- 7- Cheruiyot Sigei E, Muturi M, Bii Ch. Antifungal activities of *Camellia sinensis* crude extract, mixture with milk, on selected pathogenic and mycotoxic fungi. *J. Med. Plants Res*. 2015;9(42):1070-80.
- 8- Cheruiyot SE, Muturi M, Bii C. Antifungal activities of *Camellia sinensis* crude extract on selected pathogenic and mycotoxic fungi. *J Bacteriol Mycol*. 2015;2(2):1-7.
- 9- Jigisha A, Pankaj G, Nishant R. Comparative study of antibacterial and anti-proliferative potential of grean tea from different geographical locations in India. *Asian J Pharm Clin Res*. 2015;8(1):253-8.
- 10- Madhura MG, Shweta RD, Weerendra B, et

مؤثر موجود در عصاره چای سبز ایران از نظر ایجاد و یا عدم ایجاد پیوندهای شیمیایی مؤثر ضد میکروبی نیز تحقیق صورت پذیرد. از طرفی دیگر پیشنهاد می شود که بر روی این ترکیبات با دیدگاه جایگزین مناسب مصرف داروی شیمیایی، آزمایشات موازی و مکمل انجام پذیرد تا در صورت موفقیت آمیز بودن آزمایشات، مقاومت دارویی و عوارض جانبی داروها کم رنگ تر شوند.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از حداقل غلظت مهارتی حاصل از دو داروی ایتراکونازول و وریکونازول و عصاره های آبی و الکلی و ترکیب داروها و عصاره ها باهم، عصاره های آبی و متانولی چای سبز دامنه محصول لاهیجان هیچ گونه اثر ضد قارچی بر سوش های آسپرژیلوس مورد بررسی نداشتند که این نتایج مطابق با نتایج پژوهش های مشابه بود. از طرفی نتایج حاصل از حداقل غلظت مهارتی ترکیب داروها و عصاره ها نشان دهنده وجود اثرات هم افزایی در برخی از ترکیبات داروها و عصاره ها شامل: (۱) ترکیب عصاره آبی چای سبز و ایتراکونازول در آسپرژیلوس فومیگاتوس (ATCC₂₇₈ ۲) ترکیب عصاره آبی چای سبز و ایتراکونازول در آسپرژیلوس نایجر (ATCC₉₁₄₂ ۳) ترکیب عصاره متانولی چای سبز و ایتراکونازول در آسپرژیلوس نایجر (ATCC₉₁₄₂ ۴) ترکیب عصاره آبی چای سبز و وریکونازول در آسپرژیلوس فلاووس (ATCC₃₉ ۵) ترکیب عصاره آبی چای سبز و وریکونازول در آسپرژیلوس فومیگاتوس (ATCC₂₇₈ ۶) بود که نشان دهنده قابلیت جایگزین کردن این ترکیبات به جای دو داروی ایتراکونازول و وریکونازول و کاهش مسئله مقاومت و اثرات جانبی دارو می باشد. این بررسی برای اولین بار در پژوهش ما ارزیابی شده و نتایج حاصل از حداقل غلظت مهارتی دو داروی ایتراکونازول و وریکونازول نشان دهنده حساسیت نیمی از سویه ها نسبت به ایتراکونازول و مقاومت تمامی سویه ها نسبت به وریکونازول بوده است.

تشکر و قدردانی: تحقیق ذکر شده پایان نامه دانشجویی سرکار خانم فنوش سرخانی مقدم می باشد لذا بدین وسیله از دانشگاه آزاد اسلامی خصوصاً واحد کرج که شرایط را برای بررسی های پیرامون تحقیق انجام شده فراهم نمودند کمال تشکر را داریم.

تعارض منافع: هیچ موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تاییدیه اخلاقی: از طرف نویسندگان موردی اعلام نشده است.

سهم نویسندگان: فنوش سرخانی مقدم (نویسنده اول) دانشجو کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، محمد هادی فکور (نویسنده دوم) استادیار و عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد هیدج (طراح و مشاور پروژه)، آذر سبکبار (نویسنده سوم و مسئول) دانشیار

- 17- Mousavi B, Hedayati MT, Hedayati N, Ilkit M, Syedmousavi S. Aspergillus species in indoor environments and their possible occupational and public health hazards. *Curr Med Mycol.* 2016; 2(1):36-42.
- 18- Kemoi EK, Nyerere A, Gross U, et al. Diversity of azoles resistant aspergillus species isolated from experience and Naïve Soils in Nairobi County and Naivasha Sub-County Kenya. *Eur. Sci. J.* 2017;13(36):1857-7881???
- 19- Reygaert Cw. An update on the health benefits of green tea. *Beverages J.* 2017;3(6):1-14.
- 20- Haramain SE, Almaghboul AZ, Ahmed AO. Antimicrobial activity and phytochemical screening of Chinese green tea (*Camellia Sinensis L.*). *ARPN J. Sci. Technol.* 2015;5(5):246-52.
- 21- Naeini A, Shayegh SSH, Shokri H. In vitro antifungal effect of herbal mixture (*Nigella sativa*, *Foeniculum vulgare* and *Camellia sinensis*) against *Candida* species isolated from denture wearers. *J Herbmec Pharmacol.* 2017;6(2):74-9.
- 22- Almada A. Leveraging the science behind tea. *J Funct Foods.* 2005;3:34-5.
- 23- Park BJ, Taguchi H, Kamei K, Matsuzawa T, Hyon SH, Park JC. In vitro antifungal activity of epigallocatechin 3-O gallate against clinical isolates of dermatophytes. *Yonsei Med J.* 2011;52:535-8.
- 24- Abraham J S. Archana Comparative analysis of antimicrobial activity of leaf extracts from fresh green tea, commercial green tea and black tea on pathogens. *J. Appl. Pharm. Sci.* 2001;8:149-52.
- al. Antifungal effect of green tea extracts on oral *Candida* species: An in vitro study. *J. Adv. Clin. Res. Ins.* 2016;3(1):1-4.
- 11- Davey KG, Holmes AD, Johnson EM, Szekely A, Warnock DW. Comparative evaluation of fungitest and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* 1998;36(4):926-30.
- 12- Naeini A, Jalayer Naderi N, Shokri H. Analysis and in vitro anti- *Candida* antifungal activity of *Cuminum cyminum* and *Salvadora persica* herbs extracts against pathogenic *Candida* strains. *J. Med. Mycol.* 2014;24:13-8.
- 13- Fakoor MH, Rasooli I. Pathogen control by antioxidative characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oil. *Acta Horticulture.* 2008;786:125-36.
- 14- Mohammadpour H, Moghimipour E, Rasooli I, Fakoor MH, Alipoor Astaneh Sh, Shehni Moosaie S, et al. Chemical composition and antifungal activity of *Cuminum cyminum L.* essential oil from Alborz mountain against *Aspergillus* species. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.* 2012;7(2):50-5.
- 15- Rasooli I, Fakoor MH, Yadegarinia D, Gachkar L, Allameh A, Rezaei MB. Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum L.* essential oils. *Int. J. Food Microbiol.* 2008;122:135-9.
- 16- Rasooli I, Fakoor MH, Allameh AA, Rezaee MB, Owlia P. Phytoprevention of aflatoxin production. *J. Med. Plants.* 2009;8(5):97-104.