Horizon of Medical Sciences
Volume 24, Issue 3, Summer 2018
Pages: 223-230
Type: Original Research

Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 15:39 +0430 on Thursday May 23rd 2019

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

Sarkhani Moghaddam F.[1] *MSc*, Fakoor MH.[2] *PhD*, Sabokbar A.* *PhD*, Ebrahimzadeh M.[1] *PhD*
*Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.
[1]Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.
[2]Department 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* accordaing to microdilution method to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC).

Findings: Two strains of *A.flavus* $ATCC_{39}$ and *A.terreus* $ATCC_{274}$ 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* $ATCC_{9142}$ and *A.fumigatus* $ATCC_{278}$. Also, the combined methanol extracts of green tea and itraconazole against *A.niger* $ATCC_{9142}$ and the combined aqueous extracts of green tea and voriconazole against *A.flavus* ATCC 39 and *A.fumigatus* $ATCC_{278}$ 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 هم افزایی عصارههای آبی و الکلی چای سبز با داروهای ایتراکونازول و وریکونازول بر روی گونه های آسپرژیلوس

فرنوش سرخانی مقدم MSc
گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی،کرج، ایران.
محمدهادی فکور PhD
گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی،هیدج، ایران.
آذر سبک‌بار* PhD
گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی،کرج، ایران.
مهدیس ابراهیم‌زاده PhD
گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی،کرج، ایران.

چکیده
اهداف: در این مطالعه، جایگزنی 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 مهاری و حداقل غلظت قارچ کشی موردبررسی قرار گرفت.
یافته‌ها: دوسویه آسپرژیلوس فلاووس ATCC 39 و آسپرژیلوس ترئوس ATCC 274 نسبت به داروی ایتراکونازول حساس و دوسویه دیگر مقاوم بودند. تمامی ٤ سویه موردبررسی 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 نایجرATCC9142 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: ۱۳۹٦/۱۲/۲۷
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. کونیدی های 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 سیستیک فایبروزیز، آسپرژیلوزیس مهاجم (IA)، آسپرژیلوزیس برونکوپولمونری آلرژیک، آسپرژیلوزیس پولمونری مزمن[2].
آسپرژیلوس ها 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 مشاهده‌شده است. مطالعات نشان داده است، علت این مقاومت دارویی، ایجاد یک موتاسیون نقطه‌ای در ژن سیتوکروم $P_{51}A$ 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 دوچندان کرده است. چای سبز محبوب‌ترین نوشیدنی در سرتاسر جهان است که از برگ‌های گیاهی بانام علمی *Camellia sinensis* گرفته‌شده است. چای سبز دارای ترکیباتی مانند پلی فنول‌ها و آلکالوئیدها شامل: فلاوونول ها، فلاوونوئیدها، و فنولیک اسیدها هستند. چلی فنول‌ها با نام عمومی کاتچین ها، بیشترین ترکیبات موجود در برگ‌های چای سبز هستند که تقریبا ۳۰٪ وزن خشک چای سبز را تشکیل می‌دهند[5].کاتچین های موجود در چای سبز دارای فعالیت آنتی اکسیدانی قوی به علت حضور ترکیباتی مانند کاتچین (C)، اپی کاتچین (EC)، اپی گالوکاتچین (EGC)، اپی کاتچین ۳ گالاته (ECG) و اپی گالو کاتچین ۳ گالاته (EGCG) می‌باشد. پلی فنول‌های موجود در چای سبز شامل یکی از قدرتمندترین پلی فنول‌های آنتی اکسیدان موجود در چای سبز EGCG (اپی گالو کاتچین 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 فنول های چای سبز می‌تواند با کاهش رشد باکتری‌ها، خطر ابتلا به عفونت‌ها را کاهش دهد. همچنین می‌تواند به‌سلامت 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 فنول های چای سبز اثرات بسیار ویژه‌ای را علیه بسیاری از میکروارگانیسم‌ها شامل: کوکسی های 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 آنفولانزا از خود نشان دادند. مطالعات چریوت و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان داد که، عصاره ریشه چای سبز دارای

Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 15:39 +0430 on Thursday May 23rd 2019

خـواص ضـد قارچـی علیـه گونه‌هـای کاندیـدا شـامل: کاندیـدا تروپیکالیـس $ATCC_{750}$، کاندیـدا فاماتـا، کاندیـدا لوسـیتانیا و گونه‌هـای درماتوفیت‌هـا شـامل ترایکوفایتـون منتاگروفایتیـس می‌باشـد. کاندیـدا آلبیکنـس و کریپتوکوکـوس نئوفورمنـس نسبت بـه عصاره ریشـه چـای سـبز حساسـیت نشـان دادنـد[8]. در پژوهشـی دیگـر نتایـج حاصـل از مطالعـات جیگیشـا و همـکاران در سـال ۲۰۱۵ نشـان داد کـه، عصاره‌هـای متانولـی و اسـتونی چـای سـبز دارای خـواص آنتـی باکتریـال هسـتند. همچنیـن در ترکیـب عصـاره متانولـی چـای سـبز بـا داروی آمپـی سـیلین بـر روی دو باکتـری اسـتافیلوکوکوس اورئـوس و سـودوموناس آئروژینـوزا اثـرات هم‌افزایـی مشـاهده شـد، به‌گونـه‌ای کـه قطـر هالـه عـدم رشـد علیـه اسـتافیلوکوکوس اورئـوس و سـودوموناس آئروژینـوزا بـه ترتیـب از ۰/۰۷± ۳٦ بـه ۱/٤۱٤± ۳۹ میلی‌متـر و ۰/۰۷± ۲٦ بـه ۰/۰۷± ۲۹ بعـد از ترکیـب دارو و عصـاره افزایـش یافـت[9].

مادهـور\ و همـکاران در سـال ۲۰۱٦، اثـرات ضـد قارچـی عصـاره چـای سـبز بـر روی قارچ‌هـای گونـه کاندیـدا بـه روش t-test در مقایسـه بـا گـروه شـاهد اثبـات کردنـد[10]. لـذا تاکنـون مطالعاتـی انجـام پیرامـون اثـر ضـد قارچـی عصـاره آبـی و متانولـی چـای سـبز به‌ویـژه چـای سـبز ایرانـی بـر روی گونه‌هـای آسـپرژیلوس صـورت نپذیرفتـه و از طرفـی تابه‌حـال پژوهشـی مبنـی بـر بررسـی اثـرات هم‌افزایـی حاصـل از ترکیـب عصاره‌هـای آبـی و متانولـی چـای سـبز بـا دو داروی ایتراکونـازول و وریکونـازول صـورت نگرفتـه اسـت. لـذا در ایـن پژوهـش هـدف ارزیابـی فعالیـت ضـد قارچـی عصـاره آبـی و متانولـی چـای سـبز دامنـه محصـول شـهر لاهیجـان بـر روی ٤ سـویه آسـپرژیلوس موردنظـر شـامل آسـپرژیلوس فـلاووس $ATCC_{39}$، آسـپرژیلوس فومیگاتـوس $ATCC_{278}$، آسـپرژیلوس ترئـوس $ATCC_{274}$ و آسـپرژیلوس نایجـر $ATCC_{9142}$ و بررسـی اثـرات هم‌افزایـی ایـن دو عصـاره در ترکیـب بـا ایتراکونـازول و وریکونـازول بـود.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسـم‌ها و محیـط کشـت: چهـار سـویه آسـپرژیلوس شـامل آسـپرژیلوس فـلاووس $ATCC_{39}$، آسـپرژیلوس فومیگاتـوس $ATCC_{278}$، آسـپرژیلوس نایجـر $ATCC_{9142}$ و آسـپرژیلوس ترئـوس $ATCC_{274}$ از بخـش قارچ‌شناسـی دانشـکده علـوم پزشـکی مازنـدران و دانشـگاه علـوم پایـه شـاهد تهیـه و جهـت کشـت و انجـام بررسـی‌های موردنظـر بـه آزمایشـگاه میکروبیولـوژی دانشـگاه آزاد کـرج منتقـل شـد. محیط‌هـای کشـت سابورودکسـتروزآگار و $RPMI_{1640}$ مربـوط بـه شـرکت (Merck co. Jermany) بـود.

تهیـه سوسپانسـیون اسـپور قـارچ: جهـت تهیـه هـر یـک از سوسپانسـیون‌های اسـپور قـارچ، مطابـق پروتـکلCLSI A2-38 سـال ۲۰۱۲ انجـام شـد. پـس از کشـت قـارچ موردنظـر در اسـلنت شـیب‌دار سابورودکسـتروزآگار بـه مـدت ۲ هفتـه، برداشـت اسـپور توسـط آب مقطـر اسـتریل و توئیـن ۸۰ (Merck co. Jermany) انجـام و شـیک شـد. طول‌مـوج شـمارش سوسپانسـیون اسـپور قـارچ ۵۳۰ نانومتـر و محـدوده جـذب نـوری بـرای ٤ سـویه آسـپرژیلوس موردنظـر بـه شـرح زیـر بـود:

۱) آسـپرژیلوس فـلاووس= ۷۸-۸۲٪ ۲) آسـپرژیلوس فومیگاتوس= ۸۰-۸۲٪ ۳) آسـپرژیلوس نایجـر= ۸۰-۸۲٪ ٤) آسـپرژیلوس ترئـوس= ۸۰-۸۲٪

زمانـی کـه جـذب نـوری هرکـدام از سـوش هـای قارچـی موردنظـر در محـدوده مناسـب قـرار گرفـت، در ایـن حالـت هرکـدام از سوسپانسـیون‌ها حـاوی ۱۰٦ اسـپور بـر میلی‌لیتـر از قـارچ موردنظـر بـوده اسـت. محیـط کشـت $RPMI_{1640}$ اسـتریل حـاوی MOPS جهـت تهیـه سوسپانسـیون اسـپور قارچـی مدنظـر بـود و رقـت اسـپور مطابـق CLSI A2-38 برابـر ٤ ۱۰ اسـپور بـر میلی‌لیتـر تهیـه شـد.

اسـتوک داروهـای ایتروکونـازول و وریکونـازول: بـه جهـت تهیـه اسـتوک دارویـی مقـدار ۰/۰۰۳۲ گـرم ایتراکونـازول و وریکونـازول برحسـب گـرم مطابـق فرمـول زیـر را بـا ۵ میلی‌لیتـر از DMSO خالـص به‌عنـوان حـلال داروهـا و همچنیـن رفـع آلودگی‌هـای احتمالـی باهـم ترکیـب شـد. غلظـت اولیـه داروهـا ۱٦ میکروگـرم بـر میلی‌لیتـر بـود. ترکیـب را ۳۰ دقیقـه در دمـای اتـاق قـرار داده تـا داروهـا به‌طـور کامـل در DMSO حـل شـدند. ۱۰۰ میکرولیتـر از محلـول حاصـل را درون لوله‌آزمایـش اسـتریل ریختـه و مقـدار ۹۰۰ میکرولیتـر محیـط کشـت $RPMI_{1640}$ حـاوی MOPS اسـتریل بـه آن اضافـه شـد.

غلظـت داروهـای مورداسـتفاده درون اولیـن چاهـک میکروپلیـت الیـزا ۰/۱ رقیق‌شـده و معـادل ٦٤ میکروگـرم بـر میلی‌لیتـر بـود مابقـی چاهک‌هـا به‌صـورت سـریال رقـت معـادل ۳۲، ۱٦، ۸، ٤، ۲، ۱، ۰/۵ میکروگـرم بـر میلی‌لیتـر لحـاظ شـد. رقـت دارو توسـط محیـط کشـت $RPMI_{1640}$ حـاوی MOPS اسـتریل انجـام شـد[11].

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

$$\text{وزن}\,(mg) = \frac{\text{حجم حلال}\,(mL) \times \text{غلظت دارو}\ {}^{\mu g}/_{mL}}{Assay\ potency\ (\mu g) \times 10} = \frac{5 \times 640}{100 \times 10} = 0/0032gr$$

عصاره‌هـای آبـی و متانولـی بـرگ چـای سـبز: جهـت تهیـه عصاره‌هـای آبـی و متانولـی برگ‌هـای چـای سـبز، برگ‌هـای خشک‌شـده ایـن گیـاه کـه حاصـل کشـت تـازه سـال ۹٤ و محصـول کارخانـه تولیـد چـای دامنـه لاهیجـان بـود بـه روش خیسـاندن عصـاره گیـری شـد. ابتـدا ۱۰۰ گـرم از گیـاه خردشـده را درون دکانتـور ریختـه و ۳۰۰ میلی‌لیتـر از هـر حـلال یعنـی آب بـرای عصـاره آبـی و متانـول بـرای عصـاره متانولـی بـه آن اضافـه شـد بطوریکـه حـلال کامـلاً سـطح گیـاه را پوشـاند. جهـت جلوگیـری از تابـش مسـتقیم نـور خورشـید و جلوگیـری از تغییـرات، عصـاره گیـری در منطقـه‌ای دور از نـور انجام‌شـده و جهـت جلوگیـری از تبخیـر حـلال درب ظـرف عصـاره گیـری محکـم بسـته شـد. عمـل عصـاره گیـری را ضمـن تـکان دادن و هـم زدن مکـرر بـه مـدت ۵-۲ روز در حـرارت اتـاق انجـام شـد. سـپس عصاره‌هـا صـاف شـده و بـرای خـروج حـلال از آن‌هـا عصاره‌هـا بـه مـدت ۷-۵ روز در دمـای محیـط نگهـداری شـدند. سـپس عصاره‌هـای حاصـل، درون لولـه فالکـون هـای ۱۵ میلی‌لیتـری ریختـه و بـا اسـتفاده از دسـتگاه لیوفلیزاسـیون (دانشـکده قارچ‌شناسـی پزشـکی دانشـگاه تربیـت مـدرس) در دمـای ۳۰- و طـی مـدت ۲ روز، بـه پـودر عصاره‌هـای

Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 15:39 +0430 on Thursday May 23rd 2019

Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 15:39 +0430 on Thursday May 23rd 2019

آبی و متانولی چای سبز تبدیل‌شده 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، ٤، ۸، ١٦، ۳۲، ٦٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر در چاهک‌های دوم تا آخر شد. برای این کار مطابق پروتکل 38-CLSI A2 غلظت چاهک اول را ٤٠ برابر در نظر گرفته و سپس برای محاسبه وزن مقدار پودر عصاره‌های مورداستفاده، از فرمول زیر استفاده شد:

میکروگرم بر میلی‌لیتر ۵۱۲۰ =٤٠×۱۲۸

$$\text{وزن}\,(mg) = \frac{\text{غلظت دارو} \times \text{حجم حلال}}{Assay\ potency \times 100} = \frac{5 \times 5120}{100 \times 10} = 0/025gr$$

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. درنهایت 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 (۰/۱۲۵gr=۲÷۰/۲۵) 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 مهاری داروها، عصاره‌ها و ترکیب آن‌ها برای بررسی اثر هم‌افزایی داروها و عصاره‌ها باهم مطابق پروتکل CLSI A2-38 به روش رقیق‌سازی درون میکروپلیت‌های ۹٦ خانه الایزا انجام گرفت.

برای این منظور برای تعیین حداقل غلظت مهاری داروی ایتراکونازول به این صورت عمل شد که در شرایط کاملاً استریل، در تمامی چاهک‌های میکروپلیت به‌جز شاهد، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر $RPMI_{1640}$ حاوی MOPS استریل ریخته شد، سپس به چاهک اول ۱۰۰ml 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 ۱۰٤ افزوده شد. برای بررسی دقیق نتیجه کار، یک چاهک را به‌عنوان شاهد منفی که شامل ۱۰۰ میکرولیتر $RPMI_{1640}$ حاوی MOPS استریل و ۱۰۰ میکرولیتر داروی ایتراکونازول لحاظ شد. درون چاهک دیگر به‌عنوان شاهد مثبت، ۱۰۰ میکرولیتر $RPMI_{1640}$ 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. میکروپلیت ها 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 مهاری بررسی شد.حداقل غلظت مهاری سایر داروها و عصاره‌ها شامل ایتراکونازول، عصاره آبی چای سبز، عصاره متانولی چای سبز، و ترکیب دوبه‌دوی داروها و عصاره‌ها به همین روش بررسی شد[13].

حداقل غلظت قارچ کشی از هرکدام از چاهک‌ها که در آن رشد کلنی قارچی مشاهده‌شده بود و دو چاهک قبل از آن به کمک سوآب استریل به روش کشت چمنی بر روی محیط سابورودکستروز آگار کشت داده شد و سپس پلیت ها را درون انکوباتور ۳۵ به مدت ۵-۳ روز قرار داده و بعد از گذشت مدت‌زمان موردنظر تعداد کلنی‌های هر پلیت را موردبررسی قرار می‌گرفت. هر پلیت که در آن کمتر از ٤ پرگنه قارچی مشاهده شد به‌عنوان حداقل غلظت قارچ کشی لحاظ شد[14,15,16].

بررسی‌های آماری: در این تحقیق، حداقل غلظت‌های مهاری 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 ایتروکونازل در مقایسه با داروی وریکونازول درنتیجه 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 استثنا 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 مهاری نشان‌دهنده وجود اثرات هم‌افزایی در ترکیباتی مانند ترکیب عصاره آبی چای سبز و داروی ایتراکونازول بر روی آسپرژیلوس فومیگاتوس $ATCC_{278}$ با حداقل غلظت مهاری ٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. این در حالی است که حداقل غلظت مهاری برای داروی ایتراکونازول به‌تنهایی ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای قارچ یادشده گزارش‌شده بود (جدول شماره ۱). حداقل غلظت مهاری در ترکیب هم‌افزایی عصاره آبی چای سبز و ایتراکونازول در آسپرژیلوس نایجر $ATCC_{278}$ با ٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با ١٦میکروگرم بر میلی‌لیتر برای داروی ایتراکونازول به‌تنهایی گزارش شد. همچنین در ترکیب هم‌افزایی

عصاره متانولی چای سبز و ایتراکونازول در آسپرژیلوس نایجر $ATCC9_{142}$ ٤میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با ١٦ میکروگرم بر میلی‌لیتر داروی ایتراکونازول به‌تنهایی در این قارچ گزارش شد (جدول شماره ۱).

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

عصاره و دارو / سویه قارچی	ایتراکونازول	وریکونازول	عصاره آبی چای سبز	عصاره متانولی چای سبز	ترکیب عصاره آبی چای سبز و ایتراکونازول	ترکیب عصاره متانولی چای سبز و ایتراکونازول	ترکیب عصاره آبی چای سبز و وریکونازول	ترکیب عصاره متانولی چای سبز و وریکونازول
آسپرژیلوس فلاووس ۳۹	۰/۵±۰/۰۵	١٦±۰/۱	۰±۰	۰±۰	٤±۰/۰۱	٤±۰/۰۲	۸±۰/۰۱	٦٤±۲
آسپرژیلوس فومیگاتوس ۲۷۸	۸±۰/۰۵	۸±۰/۲	۰±۰	۰±۰	٤±۰/۰۲	١٦±۱	٤±۰/۰۱	٦٤±۱
آسپرژیلوس ترئوس ۲۷٤	۰/۵±۰/۰۵	۸±۰/۰۱	۰±۰	۰±۰	١٦±۰/۱	٤±۰/۵	١٦±۰/۱	۳۲±۰/۵
آسپرژیلوس نایجر	١٦±۰/۱	٤±۰/۰۲	۰±۰	۰±۰	٤±۰/۰۱	٤±۰/۲	۳۲±۰/۵	۱۲۸±۲

اعداد میانگین سه تکرار به صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشد.
مقادیری که در هر ستون نشان داده‌شده 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 $ATCC_{39}$ با حداقل غلظت قارچ کشی ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با ١٦ میکروگرم بر میلی‌لیتر داروی وریکونازول در این قارچ و درنهایت در ترکیب عصاره آبی چای سبز و وریکونازول در آسپرژیلوس فومیگاتوس $ATCC_{278}$ با ٤ 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 CLSI دو سوش آسپرژیلوس فلاووس $ATCC_{39}$ و آسپرژیلوس ترئوس با $ATCC_{274}$ هر دو با ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به داروی ایتراکونازول حساس و سویه آسپرژیلوس فومیگاتوس $ATCC_{278}$ با میکروگرم بر میلی‌لیتر و آسپرژیلوس نایجر $ATCC_{9142}$ با ١٦ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به ایتراکونازول مقاوم بودند. از طرفی تمامی سویه‌های آسپرژیلوس موردبررسی با دارا بودن حداقل غلظت مهاری بالاتر از ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به داروی وریکونازول مقاوم بودند. همان‌طور که در جدول شماره ۱ و ۲ مشاهده می‌کنید عصاره متانولی چای سبز به‌صورت هم‌افزایی با وریکونازول فاقد ارزش حداقل غلظت قارچ کشی و مهاری است و این در حالی است که ترکیب عصاره آبی چای سبز به جهت درمان آلودگی آسپرژیلوس فومیگاتوس ارزشمند گزارش می‌شود.

جدول۲) حداقل غلظت قارچ کشی حاصل از اثر داروها و عصاره‌ها و ترکیب آن‌ها بر روی قارچ‌های مورد آزمایش

عصاره و دارو / سویه قارچی	ایتراکونازول	وریکونازول	عصاره آبی چای سبز	عصاره متانولی چای سبز	ترکیب عصاره آبی چای سبز و ایتراکونازول	ترکیب عصاره متانولی چای سبز و ایتراکونازول	ترکیب عصاره آبی چای سبز و وریکونازول	ترکیب عصاره متانولی چای سبز و وریکونازول
آسپرژیلوس فلاووس ۳۹	۱±۰/۰۵	١٦±۰/۱	۰±۰	۰±۰	٤±۰/۰۱	٤±۰/۰۲	١٦±۰/۰۱	٦٤±۲
آسپرژیلوس فومیگاتوس ۲۷۸	١٦±۰/۰۵	۸±۰/۲	۰±۰	۰±۰	٤±۰/۰۲	١٦±۰/۵	٤±۰/۰۱	٦٤±۱
آسپرژیلوس ترئوس ۲۷٤	۱±۰/۰۵	١٦±۰/۰۱	۰±۰	۰±۰	١٦±۰/۱	٤±۰/۵	١٦±۰/۱	۳۲±۰/۵
آسپرژیلوس نایجر	١٦±۰/۱	۸±۰/۰۲	۰±۰	۰±۰	٤±۰/۰۱	٤±۰/۲	۳۲±۰/۵	۱۲۸±۲

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

بحث

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

Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 15:39 +0430 on Thursday May 23rd 2019

Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 15:39 +0430 on Thursday May 23rd 2019

برخی گونه‌های آسپرژیلوس مثل آسپرژیلوس فومیگاتوس، آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس ترئوس و آسپرژیلوس فلاووس، مشاهده‌شده 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 ٪ فلاوونوئیدهای موجود در چای سبز و ٤٠-٣٠٪ وزن خشک چای سبز را تشکیل می‌دهند و مهم‌ترین ترکیب پلی فنولی آن EGCG (اپی گالو کاتچین ۳- گالات) می‌باشد که این ترکیبات در بدن انسان دارای خواص ضد سرطان، پیشگیری‌کننده و کاهش‌دهنده بیماری‌های قلبی- عروقی، ضدالتهاب 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 مونوسایتوژنز، باسیلوس سرئوس، سالمونلا تیفی موریوم، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، یرسینیا انتروکولیتیکا، ویبریو کلرا، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس پایوژنز، پرووتلا اینترمدیا، خواص ضد ویروسی آن علیه ویروس‌هایی مانند: اپشتین بار ویروس (EBV)، هپاتیت B و HIV1 و هپاتیت C هرپس سیمپلکس ویروس ۱ (HSV1)، آنفولاتزا تیپ A H5N2 ,H3N2 ,H1N1 و آنفولانزا تیپ B. خواص ضد انگلی آن علیه انگلی مانند: تریپانوزوما کروزی و خواص ضد قارچی آن علیه قارچ‌هایی مانند: گونه‌های اکتینومایسس، آسپرژیلوس نایجر و کاندیدا آلبیکنس می‌باشد[19]. هارامایین و همکاران مطالعاتی را مبنی بر بررسی اثر ضدمیکروبی 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 (٢٤ تا ٢٨ میلی‌متر) علیه تمام باکتری‌های مورد بررسی از خود نشان داد. عصاره آبی چای سبز اثر ضد قارچی متوسطی را علیه اشرشیا کلی (١٦میلی‌متر) 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 ازجمله آسپرژیلوس نایجر بی‌اثر بودند، مطابقت دارد[20].

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 می‌کرد. 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 داروهایی شیمیای را باهم کاهش دهند. همچنین با توجه به اینکه چای سبز *Camelia Sinesis L* از خشک‌کردن برگهای تازه چای حاصل می‌شود. این گیاه حاوی ترکیبات پلی فنولیک شامل اپی گالوکاتشین -۳- گالات (3-Epigallocatechin-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 گالوکاتچین گالات موجود در چای سبز بر روی گونه‌های درماتوفیت شامل ترایکوفاتیون روبروم و ترایکوفاتیون مفتاگروفایستین پرداختند. در این پژوهش هر دوی این قارچها نسبت به اپی گالوکاتچین گالات حساس و دارای محدوده ٤-٢=$MIC_{٥٠}$ میکروگرم بر میلی لیتر و ٨-٤=$MIC_{٩٠}$ میکروگرم بر میلی‌لیتر 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 ١٦ میلی‌متر، انتروکوکوس فکالیس ٢٤ میلی‌متر، سالمونلا تیفی ١٢ میلی‌متر، استافیلوکوکوس اورئوس ٦ میلی متر، سودوموناس آئروژینوزا ١٠ میلی‌متر بود و بر روی آسپرژیلوس نایجر، کاندیدا آلبیکس، فوزاریوم و ویبریو کلرا بی‌اثر بودند[24]. لذا پیشنهاد می‌شود جهت شناسایی و بررسی خواص ضدمیکروبی 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

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

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از حداقل غلظت مهاری حاصل از دو داروی ایتراکونازول و وریکونازول و عصاره‌های آبی و الکلی و ترکیب داروها و عصاره‌ها باهم، عصاره‌های آبی و متانولی چای سبز دامنه محصول لاهیجان هیچ‌گونه اثر ضد قارچی بر سوش های آسپرژیلوس موردبررسی نداشتند که این نتایج مطابق با نتایج پژوهش‌های مشابه بود. از طرفی نتایج حاصل از حداقل غلظت مهاری ترکیب داروها و عصاره‌ها نشان‌دهنده وجود اثرات هم‌افزایی در برخی از ترکیبات داروها و عصاره‌ها شامل: ۱) ترکیب عصاره آبی چای سبز و ایتراکونازول در آسپرژیلوس فومیگاتوس $ATCC_{278}$ ۲) ترکیب عصاره آبی چای سبز و ایتراکونازول در آسپرژیلوس نایجر $ATCC_{9142}$ ۳) ترکیب عصاره متانولی چای سبز و ایتراکونازول در آسپرژیلوس نایجر $ATCC_{9142}$ ٤) ترکیب عصاره آبی چای سبز و وریکونازول در آسپرزیلوس فلاووس $ATCC_{39}$ ۵) ترکیب عصاره آبی چای سبز و وریکونازول در آسپرژیلوس فومیگاتوس $ATCC_{278}$ بود که نشان‌دهنده قابلیت جایگزین کردن این ترکیبات به‌جای دو داروی ایتراکونازول و وریکونازول و کاهش مسئله مقاومت و اثرات جانبی دارو می‌باشد. این بررسی برای اولین بار در پژوهش ما ارزیابی‌شده و نتایج حاصل از حداقل غلظت مهاری دو داروی ایتراکونازول و وریکونازول نشان‌دهنده حساسیت نیمی از سویه‌ها نسبت به ایتراکونازول و مقاومت تمامی سویه‌ها نسبت به وریکونازول بوده است.

تشکر و قدردانی: تحقیق ذکرشده پایان‌نامه دانشجویی سرکار خانم فرنوش سرخانی مقدم می‌باشد لذا بدین‌وسیله از دانشگاه آزاد اسلامی خصوصاً واحد کرج که شرایط را برای بررسی‌های پیرامون تحقیق انجام‌شده 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: فرنوش سرخانی مقدم(نویسنده اول) دانشجو کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، محمدهادی فکور (نویسنده دوم) استادیار و عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد هیدج (طراح و مشاور پروژه)، آذر سبکبار (نویسنده سوم و مسئول) دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج (استاد راهنما در پروژه پایان‌نامه)، مهدیس ابراهیم زاده(نویسنده چهارم) استادیار و عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج (استاد مشاور در پروژه پایان‌نامه) می‌باشند.

منابع مالی: کلیه منابع مالی متعلق به پایان‌نامه دانشجویی سرکار خانم فرنوش سرخانی مقدم می‌باشد که مطابق با بخشنامه‌های دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج تأمین‌شده 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

Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 15:39 +0430 on Thursday May 23rd 2019

Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 15:39 +0430 on Thursday May 23rd 2019

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.

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 Herbmed 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.