



Scan online to view this article

**Comparison of anti-candida effects of aqueous,
ethanolic extracts and essential oil of *E. angustifolia*
with fluconazole on the growth of clinical strains of *Candida*
Tohid Piri Gharaghie^{1,*}, Sameh Hajimohammadi²**

1. Sina Borna Aria (SABA) Co., Ltd Lab, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2. Department of Electrical Engineering, Faculty of Engineering, University Of Eyvanakey, Eyvanakey Branch, Eyvanakey, Iran.

Abstract

Aim and Background: *Candida* species are *opportunistic* pathogens that can be considered as the main cause of a wide range of diseases. Due to the increased resistance of these fungi to chemical drugs and also the adverse effects of these compounds on patients, it is necessary to replace these drugs with herbal compounds. In this study, the antifungal effect of aqueous and ethanolic extracts and essential oil of *E. angustifolia* on the growth of *Candida albicans* with fluconazole was compared.

Materials and Methods: In this laboratory study conducted in 1398 in Shahrekord Azad University Biotechnology Research Center, 80 candidate fungal samples were prepared from Parsian Hospital in Shahrekord and 50 *Candida albicans* samples were isolated by diagnostic tests. *E. Angustifolia* plants were obtained from Shahrekord Azad University Faculty of Agriculture. The extract was extracted by percolation and the essential oil was extracted by water distillation. The antifungal effect of *E. angustifolia* extracts along with *E. angustifolia* essential oil with fluconazole was compared on these isolates by disk diffusion and microdilution methods.

Results: The minimum and maximum diameter zone of inhibition obtained by disk diffusion method for *E. angustifolia* extracts, no growth halo formation with 1 and the lowest and maximum halo diameter for *E. angustifolia* essential oil were 6 and 37 mm. Therefore, the mean diameter of non-growth zone of inhibition for *E. angustifolia* extracts was 1 and for *E. angustifolia* the essential oil was 23.4 mm. Comparison of the mean diameter of 25 mg fluconazole inhibition zone as control with an average of 16.26 mm shows a weaker antifungal performance and a significant difference compared to *E. angustifolia* essential oil. ($P \leq 0.05$). The minimum inhibitory concentrations (MIC) of ethanolic and aqueous extracts of *E. angustifolia* and fluconazole were 4, 8, and 8 mg/ml, respectively; While the minimum fungicidal concentrations (MFC) were 8, 16, and 8 mg/ml, respectively; Showed a significant difference in inhibition of *E. angustifolia* ethanolic extract compared to 25 mg fluconazole disk ($P \leq 0.01$).

Discussion and Conclusion: According to the results of the above research, it seems that the ethanolic extract of *E. angustifolia* can be used as a suitable drug candidate with better antifungal performance than fluconazole in the pharmaceutical industry.

Keywords: Essential oil, Fluconazole, *Candida albicans*, *E. angustifolia* extract, Iau Science .

Corresponding author:

Sina Borna Aria (SABA) Co., Ltd Lab, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Email: tohidpirie@yahoo.com



برای مشاهده این مقاله به صورت
آنلاین اسکن کنید

مقایسه اثرهای ضد کاندیدایی عصاره های آبی و اتانولی

و اسانس گیاه سرخارگل (*Echinacea angustifolia*)

با داروی فلوکونازول بر رشد سویه های کلینیکی قارچ کاندیدا آلبیکنس

توحید پیری قراقیه^{۱*}، سامه حاجی محمدی^۲

۱. شرکت سینا برنا آریا (SABA)، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲. گروه برق، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه غیرانتفاعی واحد ایوانکی، ایوانکی، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: گونه های کاندیدا، پاتوژن های فرصت طلبی هستند که به دلیل افزایش مقاومت به داروهای شیمیایی لازم است که داروهایی با ترکیب های گیاهی جایگزین این داروها شود. در این تحقیق به مقایسه اثر ضدقارچی عصاره آبی و اتانولی و اسانس قسمت گلریزه گیاه *E. angustifolia* روی رشد کاندیدا آلبیکنس با داروی فلوکونازول پرداخته شده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه آزمایشگاهی که در سال ۱۳۹۸ در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد شهرکرد انجام گرفت، ۸۰ نمونه قارچی کاندیدایی از بیمارستان پارسیان شهرکرد تهیه و با انجام تست های تشخیصی ۵۰ نمونه کاندیدا آلبیکنس جدا شد. بوته های گیاه *E. angustifolia* از مزرعه آموزشی پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد شهرکرد تهیه شد. استخراج عصاره به روش پرکولاسیون و استخراج اسانس به روش تقطیر با آب صورت گرفت. مقایسه اثر ضدکاندیدایی عصاره و اسانس *E. angustifolia* با داروی فلوکونازول، با دو روش دیسک دیفیوژن و میکرودیالوژن برات انجام شد.

نتایج: میانگین قطر هاله های عدم رشد برای عصاره های *E. angustifolia* ۱ و برای اسانس *E. angustifolia* ۲۳/۴ میلی متر بود. مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد فلوکونازول ۲۵ میلی گرمی به عنوان شاهد با میانگین ۱۶/۲۶ mm نشان دهنده عملکرد ضدقارچی ضعیف تر و تفاوت معنی دار آن نسبت به اسانس *E. angustifolia* است ($P \leq 0.05$). میانگین حداقل غلظت عصاره اتانولی و آبی *E. angustifolia* و فلوکونازول به ترتیب ۴، ۸ و ۸ mg/ml برای MIC و ۸، ۱۶ و ۸ mg/ml برای MFC بود؛ که تفاوت معنی دار بازدارندگی عصاره اتانولی *E. angustifolia* نسبت به دیسک ۲۵mg فلوکونازول را نشان داد ($P \leq 0.01$).

بحث و نتیجه گیری: با توجه به نتایج حاصل از تحقیق فوق، به نظر می رسد عصاره اتانولی گیاه *E. angustifolia* می تواند به عنوان یک کاندید دارویی مناسب با عملکردی ضدقارچی بهتر از فلوکونازول در صنایع داروسازی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: اسانس، فلوکونازول، کاندیدا آلبیکنس، عصاره *E. angustifolia*، Iau Science

مقدمه

کاندیدایزیس یکی از مهم ترین و شایع ترین عفونت های قارچی فرصت طلب در انسان است که به وسیله برخی از گونه های مخمری کاندیدا به ویژه کاندیدا آلبیکنس ایجاد می شود (۱). شیوع این عفونت ها در دو دهه گذشته رشد چشم گیری داشته است، به گونه ای که در فاصله سال های ۲۰۱۰ تا ۲۰۲۰ رشد این عفونت ها به طور تقریبی ۵ برابر

نویسنده مسئول:

شرکت سینا برنا آریا (SABA)، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
پست الکترونیکی: tohidpirie@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۲۰

شده است (۲،۱). این قارچ فرصت طلب می تواند موجب تظاهرات بالینی فراوانی از قبیل برفک، واژینیت، عفونت پوست، اندوکاردیت^۱، مننژیت^۲، آبسه مغزی، آرتریت^۳، پیلونفریت^۴ و ... در میزبان انسانی شود (۳). کاندیدا/آلبیکنس جزئی از فلور طبیعی سطوح مخاطی حفره دهانی، دستگاه گوارش و واژن است. این قارچ در سطوح مخاطی کلونیزه می شود و بنابراین بیش تر عفونت های درون زاد از این ناحیه ایجاد می شود (۳). اکثر افراد با مکانیسم دفاعی فیزیولوژیک و سیستم ایمنی سالم، رشد و انتشار این مخمر را کنترل می کنند. ولی تحت شرایط خاص و با وجود فاکتورهای مستعد کننده از قبیل دیابت، نقص سیستم ایمنی، مصرف آنتی بیوتیک های وسیع الطیف این فرصت ایجاد می شود تا کاندیدا/آلبیکنس از شکل هم زیست به شکل بیماری زا تبدیل شود و قابلیت ایجاد عفونت در بافت های مختلف و امکان ایجاد بیماری سیستمیک کشنده را داشته باشد (۳،۴). در سال های اخیر گزارش های متعددی از شکست در درمان مبتلایان به اشکال بالینی متفاوت کاندیدایزیس اشاره شده است (۱-۴). داروهای ضدقارچی با فرمولاسیون های متفاوت جهت درمان وجود دارد که در بسیاری موارد به دلیل عدم پاسخ مناسب به درمان بیماری به شکل مزمن در آمده، گاهی عودهای مکرر مشاهده می شود (۵،۶). در میان داروهای ضدقارچی داروی فلوکونازول به دلیل انتشار مناسب در اکثر بافت های بدن میزبان، استفاده گسترده تری در درمان اشکال موضعی و منتشره بیماری دارد (۷). در سال های اخیر مطالعه های انجام گرفته در مورد حساسیت گونه های کاندیدا نسبت به داروهای ضدقارچی و به خصوص فلوکونازول، مکانیسم های مولکولی مختلفی را در جهت بیان دلایل مقاومت دارویی گونه های کاندیدا نشان داده است (۸،۹). همچنین نیاز به مصرف طولانی مدت داروهای ضدقارچی که خود منجر به بروز عوارض جانبی ناشی از مصرف آن ها می گردد و شناسایی بعضی از فاکتورهای ژنتیکی در ارتباط با مقاومت دارویی نسبت به فلوکونازول محدودیت هایی را در استفاده از این قبیل ترکیب های ضدقارچی به وجود آورده است، لذا تحقیقات مختلفی در زمینه یافتن ترکیب های ضدقارچی مؤثر با منشاء طبیعی و اثرهای جانبی کم تر انجام پذیرفته است

(۱۰،۱۱). داروهای گروه آزول ها به ویژه فلوکونازول یک تری آزول دوتایی و فلورینه شده محلول در آب است که به دلیل وزن مولکولی کم، جذب آن سریع بوده و قابلیت انتشار به اکثر بافت های بدن را دارد. این داروها در بیماری های قارچی به خصوص کاندیدایزیس بسیار زیاد استفاده می گردند. فلوکونازول یک داروی آزولی است که با مهار آنزیم ۱۴ آلفا دی متیلاز اثرهای ضدقارچی خود را اعمال می کند. این دارو به طور وسیع در بیماری های قارچی به خصوص کاندیدایزیس استفاده می گردد (۱۱). به دلیل افزایش مقاومت در بین گونه های کاندیدیایی به داروهای شیمیایی و همچنین اثرهای نامطلوبی مثل تهوع، درد شکمی، استفراغ و سردرد، راش های پوستی و ... این ترکیب ها بر روی بیماران لازم است تحقیقات بیش تری در جهت جایگزینی این ترکیب ها با ترکیب های گیاهی بدون عارضه جانبی یا ترکیب های شیمیایی و یا سنجش هم اثری این ترکیب ها با آنتی بیوتیک ها، جهت کاهش سمیت داروهای شیمیایی انجام شود (۱۲).

E. angustifolia از جمله گیاهانی که در سال ۱۹۴۰ در فهرست ملی گیاهان دارویی آمریکا قرار داشت اما پس از جایگزینی انواع آنتی بیوتیک ها از فهرست مزبور حذف شد (۱۳،۱۴). سرخارگل گیاهی علفی و چند ساله از تیره کاسنی است که ارتفاع آن حداکثر به ۱ تا ۱/۵ متر می رسد. برگ های پایین ساقه تخم مرغی تا نریزه ای شکل هستند که حداکثر ۳۰ سانتی متر طول و ۲۰ سانتی متر عرض دارند (۱۳). پلی ساکاریدهای این گیاه شامل اکیناسائین، اکیناکوزید و آکینولون هستند که دارای خواص دارویی و ضد میکروبی مشابه با ترکیب های گیاه سیر و آلیسین است (۱۳،۳۴). این گیاه در سال های اخیر به علت مقاومت های میکروبی بار دیگر مورد توجه قرار گرفته است و در طب سنتی در درمان سرماخوردگی، مارگزیدگی، سینوزیت و مسمومیت های خونی استفاده می شود. عصاره این گیاه هم چنین بر سیستم گوارش اثر داشته و دارای اثرهای تب بری و ضد رنشیت است. از خواص دیگر این گیاه می توان به خواص آنتی اکسیدانی، التیام زخم، درمان مالاریا و ... اشاره کرد (۱۵). از آنجا که مطالعه ای بر روی اثرهای ضدقارچی عصاره قسمت گلریزه گیاه *E. angustifolia* روی رشد کاندیدا/آلبیکنس بررسی نشده است، لذا در این مطالعه به منظور مقایسه اثر ضدقارچی عصاره های آبی و اتانولی *E.*

¹Endocardit

²Meningitis

³Arthritis

⁴Pyelonephritis

angustifolia با داروی فلوکونازول روی رشد کاندیدا/آلبیکنس پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی سویه های مخمری

به دنبال کشت ۸۰ نمونه قارچی کاندیدیایی جداسازی شده از بیماران مبتلا به اشکال بالینی مختلف کاندیدیازیس که در طول سال ۱۳۹۸ به آزمایشگاه‌های قارچ‌شناسی بیمارستان پارسین شهرکرد مراجعه کرده بودند، نمونه‌ها ابتدا در محیط سابورو دکستروز آگار کشت و سپس از لحاظ میکروسکوپی و ماکروسکوپی تعیین گونه گردیدند. سپس کلنی‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط پوتیتودکستروز آگار^۵ (PDA) کشت داده شدند. مقدار ۳ ml سالین استریل ریخته با خراش پیپت پاستور روی سطح کلونی و تکان آرام محیط، کونیدی‌ها و هایفاها معلق و به وسیله شیکر مخلوط شدند. سپس جهت شناسایی سویه‌های قارچی از محیط افتراقی کروم آگار کاندیدا (تالیژن پارس، ایران) استفاده شده رنگ و مورفولوژی کلنی‌ها برای هر یک از جدایه‌ها ثبت شد. چگونگی جذب قند در ۳ نوبت به فاصله‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نسبت به حفره شاهد توسط هر یک از مخمرها با استفاده از کیت API20C (شرکت Biomerieux SA، فرانسه) مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت نتایج براساس الگوی ارائه شده کارخانه برای شناسایی کاندیدا/آلبیکنس (شکل ۱C) تعیین هویت شدند (۱۶).

تهیه مواد دارویی و گیاهی

تهیه دیسک‌های فلوکونازول و رقت‌های دارویی

طبق استاندارد انتشار از دیسک 2018 CLSI، برای تهیه دیسک‌های ۲۵ میلی گرمی فلوکونازول، ۲ میلی گرم پودر آن (Apotex, CANADA) را در ۱ میلی لیتر بافر فسفات سالین حل کرده پس از ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه استریل و توسط فیلتر سرنگی، فیلتر و به میزان ۱۲/۵ میکرولیتر استوک دارویی بر روی دیسک‌ها با قطر ۵ میلی-متر تلقیح و به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شده و پس از خشک شدن در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری گردید. در این بررسی داروی ضدقارچی (پارس دارو، ایران) به صورت پودری بود که از فرمول زیر استفاده شد:

$mg = (\mu g) / ml$ (غلظت) وزن

$(\mu g) / (ml \times \text{درجه خلوص})$
(ml)

طبق پروتکل مؤسسه استاندارد کلینیکی و آزمایشگاهی M-27-A، چون رقت ۱۶۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر نیاز بود، ۱۶ میلی گرم از دارو مذکور با درجه خلوص ۹۹/۹ میلی گرم بر میلی لیتر در ۱۰ میلی لیتر حلال آب حل گردید تا محلول استوک دارویی با رقت حدود ۱۶۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر حاصل شد. سپس به منظور تهیه رقت‌های دارویی از محیط کشت RPMI 1640 (HyClone, China) به نسبت ۱ به ۵۰ استفاده گردید و رقت‌های ۳۲، ۱۶، ۸، ۴، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰۶۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر از طریق رقت‌های سریالی تهیه گردید (۳۸). چون ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت برای یک تست استفاده می‌شود پس ۱ میلی لیتر حدودی برای ۸ تست کافی است (۱۷).

تهیه اسانس و عصاره‌های گیاهی

الف: تهیه عصاره آبی و اتانولی *E. angustifolia*

بوته‌های گیاه *E. angustifolia* کشت شده در مزرعه آموزشی پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد شهرکرد توسط کارشناس تأیید هویت شد. سپس قسمت گلریز گیاه خشک شده و ۱۰۰ گرم از پودر گیاه در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۳ ساعت روی هیتر برقی با دمای ۷۰-۸۰ درجه سلسیوس خیسانده، قرار گرفت. سپس عصاره آبی جمع‌آوری شده و در دمای ۷۰- درجه سلسیوس جهت مصارف بعدی نگهداری شد. جهت تهیه عصاره اتانولی ۵۰ گرم از قسمت گلریز گیاه در ۲ لیتر الکل ۷۰ درصد پس از سه روز در دستگاه روتاری در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۰-۳۰ دقیقه گذاشته شد. سپس حلال توسط دستگاه روتاری، جدا شد. پس از آن عصاره‌ها سانتریفیوژ (۲۵۰۰ دور بر دقیقه تا ۱۰ دقیقه) و فیلتر (۰/۴۵ میکرومتر) شده و در یخچال ۰-۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. اطراف لوله آزمایش توسط فویل برای جلوگیری از رسیدن نور به عصاره پوشانده شد (۱۸).

ب: تهیه اسانس

جهت تهیه اسانس به روش تقطیر با بخار آب، ۵۰ گرم از

۵۳۰ نانومتر و اپتیکال دندسیتی بین ۰/۱۳ - ۰/۰۹). قبل از کشت، سوسپانسیون به مدت ۳-۵ دقیقه ورتکس و به صورت کشت متراکم بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. بعد از حدود ۱۵ دقیقه دیسک‌های استریل فلوکونازول و دیسک‌های استریل حاوی رقت‌های مختلف گیاه *E. angustifolia* که توسط دی‌متیل‌سولفوکساید و RPMI 1640 رقیق شده بود به کمک پنس استریل بر روی محیط کشت قرار داده شد. دیسک‌ها باید با فاصله مناسب از هم و فاصله مناسب از دیواره قرار بگیرند. سپس قطر هاله ممانعت از رشد پس از ۲۴-۴۸-۷۲ ساعت انکوباسیون پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس اندازه‌گیری شد. هم-چنین اثر ضد میکروبی این عصاره و اسانس‌ها در مقایسه با دیسک‌های ۲۵ mg آنتی‌بیوتیک فلوکونازول مورد بررسی قرار گرفت (۲۰، ۲۱). با توجه به این که در روش دیسک دیفیوژن غلظت‌های دارو و عصاره‌های گیاهی متفاوت است، از این رو نمی‌تواند روش دقیقی برای مقایسه اعتبارسنجی عملکرد ضد میکروبی بین دارو و عصاره‌های گیاهی باشد. از این رو از روش میکرودايلوشن براث که حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی دارو و عصاره را مشخص می‌کند، جهت تأیید فعالیت ضد میکروبی، تیمارها استفاده شد.

ارزیابی تأثیر دارو فلوکونازول و عصاره آبی و اتانولی *E. angustifolia* به روش میکرودايلوشن

به منظور ارزیابی تأثیر داروهای ضدقارچی، میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای ته صاف به ابعاد ۱۲×۸ استفاده گردید. در هر سری یک چاهک کنترل در نظر گرفته شد که حاوی ۰/۱ سی‌سی محیط کشت RPMI 1640 و ۰/۱ سی‌سی سوسپانسیون قارچی رقیق شده بود. در چاهک ۱ بالاترین رقت دارویی به‌میزان ۰/۱ میلی‌لیتر ریخته شد تا چاهک ۱۰ که کم‌ترین رقت دارویی ریخته می‌شود. سپس در هر چاهک ۰/۱ سی‌سی سوسپانسیون قارچ موردنظر افزوده شد و پیتاژ شد. رقت‌های دارویی فلوکونازول در مجاورت قارچ‌ها ۰/۰۶۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، میکروگرم بر میلی‌لیتر و رقت عصاره‌ها ۰/۶۴، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی (MFC) عصاره‌ها با توجه به نتایج MIC تعیین شد. از چاهک‌هایی که رشد قارچ در آن‌ها به‌طور کامل متوقف شده بود با سواب استریل نمونه‌برداری و روی محیط کشت نوترینت و ساب‌رودکستروز آگار کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. پس از

درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت خیسانده شد و سپس با صاف کردن به وسیله کاغذ صافی واتمن و تبخیر حلال در فشار کم اسانس غلیظی به دست آمد (۳۳).

پ: تهیه رقت‌های عصاره *E. angustifolia*

عصاره به‌دست آمده از گیاه *E. angustifolia* توسط محیط کشت RPMI 1640 رقت‌سازی شد. برای این منظور غلظت ۱۶ mg/ml عصاره اتانولی و آبی به‌ترتیب توسط دی‌متیل سولفوکساید و محیط RPMI 1640 مخلوط شده و رقت‌گیری سریالی تا غلظت ۰/۶۴ mg/ml (۰/۶۴ mg/ml)، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶ انجام شد (۱۸).

تست حساسیت دارویی سویه قارچ کاندیدا آلبیکنس

نسبت به داروی فلوکونازول به روش دیسک دیفیوژن در این روش از جدایه های ۲۴-۴۸ ساعته کاندیدا/آلبیکنس رشد کرده بر روی پلیت های حاوی سابورودکستروز آگار، سوسپانسیونی از سرم فیزیولوژیک استریل حاوی ۰/۵ درصد توئین ۸۰ به تعداد $10^8 \times 1/5$ CFU/ml معادل کدورت ۰/۵ مک فارلند استاندارد تهیه و توسط اسپکتروفتومتر تNیید گردید. سپس با استفاده از سواب استریل از این سوسپانسیون بر روی محیط مولر هینتون آگار حاوی ۲ درصد گلوکز و ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر متیلن بلو تلقیح شد. دیسک های ۲۵ میکروگرمی فلوکونازول را روی پلیت ها قرار داده و پس از ۲۴-۴۸ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه، قطر نواحی مهار رشد اطراف دیسک ها اندازه گیری گردید. براساس استانداردهای تعیین شده در متد CLSI جدایه ها با قطر مهاری کمتر از ۱۴ میلی متر مقاوم، بین ۵-۲۱ میلی-متری دارای حساسیت وابسته به دوز و بیش تر از ۲۲ میلی-متر حساس نسبت به دارو طبقه بندی شدند. از سوش ATCC 18804 کاندیدا/آلبیکنس به عنوان کنترل حساس به فلوکونازول و از سوش ATCC 1023 کاندیدا/آلبیکنس به عنوان کنترل مقاوم به فلوکونازول استفاده شد (۱۹).

ارزیابی تأثیر دارو و عصاره *E. angustifolia*

ارزیابی تأثیر داروی فلوکونازول و عصاره‌های گیاهی
به‌روش دیسک دیفیوژن

روش دیسک‌گذاری طبق پروتکل مؤسسه استاندارد کلینیکی و آزمایشگاهی انجام شد. برای این کار در ابتدا از کاندیدا/آلبیکنس کشت ۲۴ ساعته تهیه شد. سپس از این نمونه‌ها سوسپانسیونی با رقت نیم مک‌فارلند آماده شد (با طول موج

۲۴ ساعت کمترین غلظتی از عصاره *E. angustifolia* و دارو فلوکونازول که قارچ در آن رشد نکرده بودند به عنوان مقادیر MFC گزارش شدند. از سویه کاندیدا آلبیکنس ATCC 18804 و ATCC 1023 به عنوان سویه استاندارد به منظور صحت عملکرد و کنترل کیفیت کار استفاده شد (۲۲).

آنالیز آماری

از نسخه ۱۶ نرم افزار SPSS برای انجام آنالیز آماری نتایج استفاده شد. تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) به همراه آزمون Tukey برای مقایسه داده ها استفاده شد. تمامی آزمون ها به شکل ۳ بار تکرار انجام شد. رسم نمودارها با نرم افزار گراف پد پریسم ۸ انجام شد. در این مطالعه از لحاظ آماری اختلاف میانگین ها در سطح $P < 0.01$ و $P < 0.05$ معنی دار تلقی شد.

نتایج

در بررسی رنگ آمیزی این پژوهش، تمام ۸۰ نمونه که از بیماران مبتلا به عفونت های جلدی، مخاطی، واژینال و عمیق تهیه شده بودند، سلول های مخمری جوانه دار در لام تشکیل دادند. پس از کشت این نمونه ها در محیط کروم آگار، ۵۰ مورد کلنی سبز رنگ مشاهده شد که به عنوان جدایه کاندیدا آلبیکنس شناسایی شدند. ۱۲ مورد دارای کلنی بنفش رنگ بودند که به عنوان کاندیدا گلابر/تا، ۱۳ مورد کلنی صورتی رنگ به عنوان کاندیدا کروزه ای و ۵ مورد کلنی آبی با هاله قهوه ای به عنوان کاندیدا تروپیکالیس شناسایی شد. سپس آزمایش جذب قند با کیت API20C (شرکت Biomerieux SA، فرانسه) انجام و نوارهای رنگی جهت تشخیص گونه کاندیدا آلبیکنس در شکل ۱ C نشان داده شد. ۵۰ نمونه کاندیدا آلبیکنس جداسازی شده به عنوان منبع برای تست های دارویی مورد استفاده قرار گرفت. سپس با استفاده از دیسک های تهیه شده طبق پروتکل موسسه استاندارد کلینیکی و آزمایشگاهی M-27-A، با رقت ۱۶۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر، تست آنتی بیوگرام سویه های قارچی انجام و هر یک از سویه ها درصدی از مقاومت را از خود نشان دادند.

نتایج دیسک دیفیوژن (Disk diffusion) فلوکونازول و عصاره *E. angustifolia*

در این روش ۴ تیمار مختلف را برای نمونه های مختلف قارچ کاندیدا آلبیکنس در نظر گرفته و داده های مربوط به هر تیمار برحسب میلی متر ثبت گردید. داروی شیمیایی فلوکونازول با ۲ تیمار عصاره آبی و اتانولی و ۱ تیمار اسانس *E. angustifolia* مقایسه و عملکرد آن ها ارزیابی شد. در این روش، بیشترین عدد در هر ردیف نمونه بهترین عملکرد محسوب می شود. هر چه اندازه هاله بیش تر باشد، میکروارگانیزم مقاومت کمتری نسبت به آن دیسک دارد. عصاره آبی و اتانولی *E. angustifolia* در این روش واکنشی نشان ندادند (شکل ۲).

انحراف معیار یکی از شاخص های پراکندگی است که نشان می دهد به طور میانگین داده ها چه مقدار از مقدار متوسط فاصله دارند. اگر انحراف معیار مجموعه ای از داده ها نزدیک به صفر باشد، نشانه آن است که داده ها نزدیک به میانگین هستند و پراکندگی اندکی دارند؛ در حالی که انحراف معیار بزرگ بیانگر پراکندگی قابل توجه داده ها است. به طور معمول داده های با اختلاف بیش تر از دو انحراف معیار از مقدار میانگین به عنوان داده های پرت در نظر گرفته و از تحلیل، خارج می شوند. مطابق با شکل ۲ (ب) انحراف معیار فلوکونازول کمتر از اسانس *E. angustifolia* بود که نشان دهنده دامنه عملکردی ضدقارچی بهتر فلوکونازول نسبت به اسانس *E. angustifolia* است. هم چنین میانگین قطر هاله عدم رشد فلوکونازول بیش تر از اسانس *E. angustifolia* بود که نشان از خاصیت ضدقارچی بهتر آن نسبت به اسانس هیچ هاله عدم رشدی در این روش برای عصاره های آبی و اتانولی در تمام تیمارها وجود نداشت که برای محاسبه آماری برابر با یک در نظر گرفته شد. در روش آماری به جای عدد حداقل، ۱ و به جای بیش تر از ۳۰ عدد ۳۱ را قرار دادیم، تا از لحاظ آماری قابل توجیه باشد. فقط در ۴ سویه شماره ۲، ۲۸، ۲۹ و ۳۱ بیشترین مقدار هاله عدم رشد برای داروی فلوکونازول برابر با ۳۱ بود در حالی که برای اسانس *E. angustifolia* تعداد ۱۳ سویه هاله عدم رشد ۳۱ را نشان دادند. در این روش داروی فلوکونازول با اسانس *E. angustifolia* و ۲ تیمار دیگر مقایسه شد، و طبق مجموع داده اندازه هاله ها و میانگین آن ها، مشخص شد که اسانس *E. angustifolia* عملکرد مشابه و حتی بهتری نسبت به داروی فلوکونازول دارد. چون هر چه اندازه هاله بیش تر باشد خاصیت ضدقارچی بهتر است. انحراف معیار اسانس *E. angustifolia* بسیار زیاد بود. داده های اسانس



Glucose Maltose Sucrose Lactose Trehalose Cellobios Raffinose

C



شکل ۱- قسمت A. سلول های مخمری جوانه دار در لام؛ قسمت B. کلنی سبز رنگ کاندیدا آلبیکنس در محیط کروم آگار؛ قسمت C. نوار رنگی جهت تشخیص کاندیدا آلبیکنس توسط کیت API20C

با توجه به جمع داده ها و مقدار میانگین عصاره اتانولی *E. angustifolia* در مقایسه با تیمار شاهد فلوکونازول، عملکرد بهتری داشته است. از لحاظ آماری نیز هر چه انحراف معیار کم تر باشد بهتر است، یعنی عصاره ها هم خوانی بهتری در هر تیمار نسبت به داروی شیمیایی فلوکونازول داشتند. با توجه به نتایج، انحراف معیار عصاره های گیاهی *E. angustifolia* نسبت به فلوکونازول کم تر است که نشان دهنده تفاوت معنی دار و عملکرد بهتر عصاره ها نسبت به فلوکونازول است ($P \leq 0.05$). هم چنین بین عصاره های گیاهی کم ترین انحراف معیار مربوط به عصاره اتانولی *E. angustifolia* است که این عصاره خاصیت ضد قارچی بهتری را از خود نشان داد.

حداقل غلظت کشندگی (MFC⁶) فلوکونازول و عصاره *E. angustifolia*

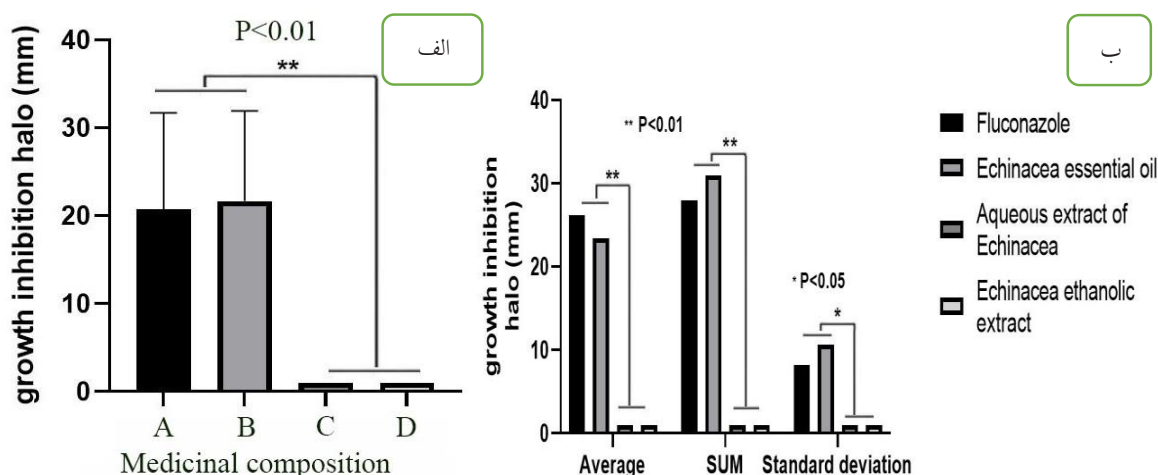
در این روش نیز (MFC) برای هر ۵۰ نمونه مختلف قارچ کاندیدا آلبیکنس ۳ تیمار در نظر گرفته، داروی شیمیایی

E. angustifolia پراکنش بیش تری داشتند. عصاره آبی *E. angustifolia* بود ($P < 0.05$). از این رو، با این که نتایج کلی میزان بازدارندگی نشان دهنده عملکرد جزیی بهتر اسانس نسبت به فلوکونازول است (شکل ۲ الف)، اما با توجه به انحراف معیار بالای اسانس (۲ ب) می توان چنین نتیجه گرفت که نتایج کلی تست دیسک دیفیوژن بر ای تعیین عملکرد ضد قارچی کافی نیست و لزوم تحقیقات بیش تر را آشکار می کند.

نتایج حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) فلوکونازول و عصاره *E. angustifolia*

در این تست حداقل غلظت بازدارندگی داروی فلوکونازول با ۲ عصاره از گیاه *E. angustifolia* مقایسه و عملکرد آن ها ارزیابی شد. کم ترین عدد در هر ردیف نمونه، بهترین عملکرد برای MIC محسوب شد. چون در همان غلظت کم از دارو رشد قارچ متوقف شده است. هر چه در غلظت کمی رشد قارچ متوقف شود، اثر پذیری دارو بیش تر است (جدول ۲).

⁶ Minimum fungicidal concentration



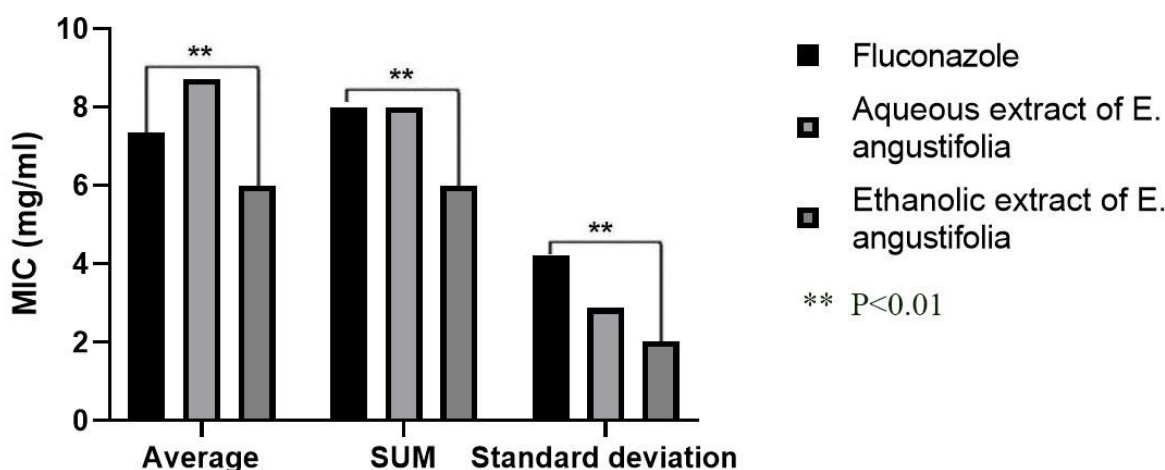
شکل ۲- نمودار مربوط به مقایسه میانگین، میانه و انحراف معیار در روش Disk برای ۴ تیمار. میزان بازدارندگی نشان دهنده عملکرد جزئی بهتر اسانس نسبت به فلوکنازول است.

(الف) میزان بازدارندگی کلی فلوکنازول (A) نسبت به اسانس (B)، عصاره های آبی (C) و الکلی (D)

(ب) انحراف معیار، میانه و میانگین عصاره های آبی، الکلی و اسانس *E. angustifolia* نسبت به فلوکنازول

عصاره اتانولی *E. angustifolia* عملکردی بهتر یا مشابه به فلوکنازول را نشان داد. مطابق نتایج MFC، تفاوت جزئی در عصاره اتانولی *E. angustifolia* با داروی فلوکنازول وجود داشت، هر چند که این تفاوت معنی دار نبود ($P > 0.05$). از لحاظ آماری هر چه انحراف معیار کمتر باشد بهتر است. از این رو، داروی فلوکنازول و عصاره اتانولی *E. angustifolia* داده های آماری مناسب با خطای میانگین

فلوکنازول با ۲ عصاره مختلف آبی و اتانولی از گیاه *E. angustifolia* مقایسه شد. کمترین عدد در هر ردیف نمونه بهترین عملکرد محسوب شد. چون در همان غلظت کم از دارو قارچ می میرد. هر چه در غلظت کمتری دارو باعث مرگ قارچ شود، اثرپذیری دارو بیشتر است. عصاره آبی *E. angustifolia* در ۲۷ سویه مقدار MFC بیش تری را نسبت داروی فلوکنازول نشان داد که نشان دهنده عملکرد ضعیف آن نسبت به فلوکنازول بود. در حالی که در ۳۸ سویه قارچی،



شکل ۳- نتایج آزمایشگاهی روش MIC، عصاره ها و فلوکنازول. کمترین عدد در هر نمونه، بهترین عملکرد برای MIC محسوب می شود. براین اساس، عصاره اتانولی *E. angustifolia* دارای کمترین مقدار MIC است و نسبت به فلوکنازول تفاوت معنی داری در سطح $P < 0.01$ را نشان می دهد.

حداقل را در بین تیمارها دارا بودند. عدد میانه عصاره اتانولی *E. angustifolia* و فلوکونازول یکسان بود.

طبق نتایج آنالیز داده ها MIC و MFC میانگین رشد ۳ تیمار با هم برابر نیست. ولی بین تیمار ۱ (فلوکونازول) با تیمار عصاره اتانولی *E. angustifolia* تفاوت معناداری وجود دارد که نشان دهنده عملکرد کلی بهتر عصاره اتانولی *E. angustifolia* نسبت به فلوکونازول است. هم چنین آنالیز نتایج دیسک دیفیوژن نشان داد که میانگین رشد تیمارها (۴ تیمار حاوی فلوکونازول، اسانس *E. angustifolia*، عصاره آبی و اتانولی *E. angustifolia*) با هم برابر نیست و بین تیمار ۱ (فلوکونازول) با تیمارهای ۲ و ۳ و ۴ (عصاره های *E. angustifolia* و اسانس *E. angustifolia*) تفاوت معناداری وجود دارد. در واقع، عصاره ها بهتر از اسانس در این روش به آزمایش دیسک واکنش نشان داده است. اما مقایسه عملکرد اسانس *E. angustifolia* نسبت به تیمار شاهد (فلوکونازول) حاکی از عملکرد بهتر فلوکونازول است.

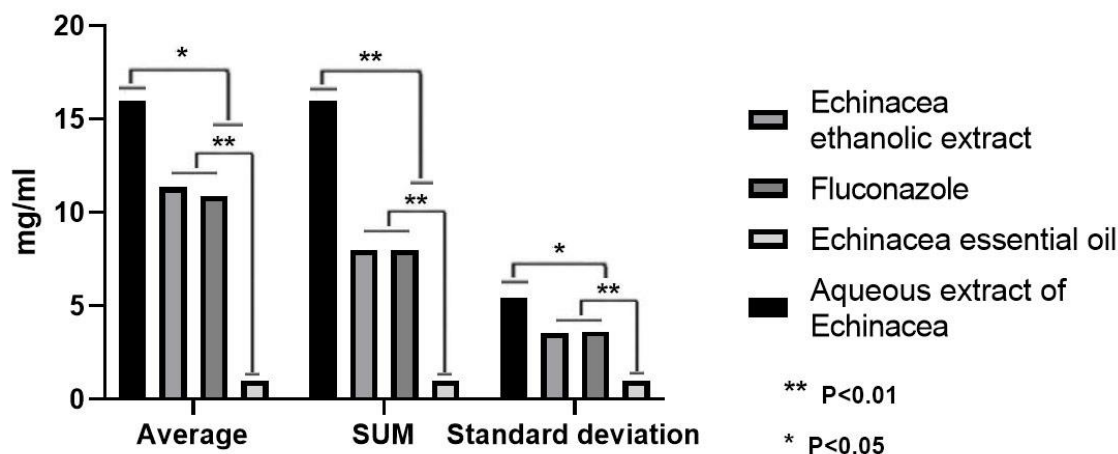
بحث

عفونت های قارچی سیستمیک ناشی از کاندیدا / آلبیکنس در طول سالیان اخیر به دلیل افزایش بیماری های تضعیف کننده

سیستم ایمنی نظیر ایدز، بدخیمی های خونی، مصرف بی- رویه کورتیکواستروئیدها، به عنوان یکی از عوامل اصلی مرگومیر به خصوص برای بیماران بستری در بیمارستان مطرح است (۲۰). شیوع این عفونت ها و استفاده بی رویه از ترکیب های ازولی مثل فلوکونازول باعث ایجاد مقاومت قارچی به این دارو شده است (۲). لذا استفاده از ترکیب ها جایگزین به ویژه گیاهان دارویی جهت درمان و پیشگیری از مقاومت ثانویه توصیه می گردد.

نتایج مطالعه Sharifi-Rad و همکاران (۲۰۱۸) با هدف بررسی خواص دارویی گونه های اکیناسه، کشت آن ها، ترکیب شیمیایی و کاربردهای بالقوه این گیاهان به عنوان عوامل آنتی اکسیدان و ضدباکتری نشان داد که عصاره گیاه اکیناسه دارای فعالیت های آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی و ایمنی بالایی است (۲۲).

بررسی خواص دارویی گونه های اکیناسه، کشت آن ها، ترکیب شیمیایی و کاربردهای بالقوه این گیاهان به عنوان عوامل آنتی اکسیدان و ضدباکتری نشان داد که عصاره گیاه اکیناسه دارای فعالیت های آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی و ایمنی بالایی است (۲۲).



شکل ۴- مقایسه انحراف معیار، میانگین و میانه عصاره های *E. angustifolia* با فلوکونازول در روش MFC. عصاره آبی *E. angustifolia* مقدار MFC بیش تری را نسبت داروی فلوکونازول نشان داد که نشان دهنده عملکرد ضعیف آن نسبت به فلوکونازول است. اما عصاره اتانولی نتایج مشابه با فلوکونازول را نشان داد.

Carolina Chiellini و همکاران (۲۰۱۷) مطالعه‌ای تحت عنوان داده‌های اولیه در مورد فعالیت ضدباکتریایی انجمن-های باکتریایی مرتبط با گیاه *Echinacea purpurea* در برابر سویه‌های کمپلکس *Burkholderia cepacia* پاتوژن-های فرصت طلب بیماران فیبروز کیستیک انجام دادند. نتایج این گروه نشان داد که باکتری‌های همزیست با گیاه *E. angustifolia* فعالیت ضد *Burkholderia cepacia* بالایی از خود نشان دادند. این مطالعه نشان داد که ترکیب‌های گیاهی اثرهای خوبی روی میکروارگانیسم‌ها دارند و می‌توان امیدوار بود که در آینده بتوان به داروهای گیاهی و به-احتمال ترکیب‌های جدیدی در جهت درمان عفونت‌های کاندیدیایی دست یافت (۲۴).

Bagheri و همکاران (۲۰۱۵) اثر ضدقارچی *Fumaria officinalis*، *Echinacea angustifolia*، سرکه سیب و انگور و فلوکونازول در برابر *Candida albicans* و *Candida glabrata* جدا شده از کاندیدیازیس واژن را بررسی کردند. براساس نتایج مطالعه این گروه، فلوکونازول در مقایسه با ترکیب‌های آلی مورد مطالعه، منطقه مهار بیش‌تری داشت. با این‌حال، سرکه‌های سیب و انگور تأثیر قابل‌توجهی در میان ترکیب‌های طبیعی داشتند. سایر ترکیب‌ها هیچ تأثیر قابل توجهی نداشتند. از این‌رو گیاهان و سرکه‌های طبیعی منطقه مهار کم‌تری نسبت به فلوکونازول داشتند، هیچ عارضه جانبی جدی نداشتند و هزینه بسیار کم‌تری را تحمیل می‌کردند (۲۵).

S. Merali و همکاران (۲۰۰۳) مطالعه‌ای تحت عنوان ارزیابی فعالیت ضدقارچی و ضد التهابی جنس اکیناسه انجام دادند. در این بررسی اسانس *Echinacea* فعالیت ضدقارچی علیه اکثر قارچ‌های بیماری‌زا نشان داد (۲۶). در مطالعه Falahati و همکاران در سال ۱۳۹۱ فعالیت ضدقارچی عصاره اتانولی موسیر ایرانی بر ضد تمامی گونه‌های کاندیدیایی نسبت به عصاره آبی بیش‌تر بود (۱۱).

Mir-Rashed و همکاران در سال ۲۰۱۰ پژوهشی با عنوان اختلال در دیواره سلولی قارچ توسط عصاره‌های ضدقارچ اکیناسه انجام دادند. براساس نتایج این گروه، *S. cerevisiae* تحت درمان با اکیناسه به‌طور قابل توجهی مستعد آسیب دیواره سلول نسبت به سلول‌های غیر تیمار شده است. این مطالعه شواهد قانع‌کننده‌ای را نشان می‌دهد که دیواره سلولی قارچ هدف عصاره گیاهان اکیناسه است و

بنابراین می‌تواند کاربرد این گیاه پزشکی در درمان میکوز را توضیح دهد (۲۷).

نتایج مطالعه حاضر همسو با نتایج Sharifi-Rad و همکاران (۲۰۱۸)، Bachir و همکاران (۲۰۱۵)، Carolina Chiellini و همکاران (۲۰۱۷)، Bagheri و همکاران (۲۰۱۵)، Mir-Rashed و همکاران (۲۰۱۰) و S. Merali و همکاران (۲۰۰۳) نشان داد که عصاره گیاهی جنس *Echinacea* نسبت به داروی شیمیایی (فلوکونازول) عملکرد ضد قارچی بهتری دارد. هم‌چنین مشخص شد که حساسیت کاندیدا آلبیکنس به عصاره اتانولی *E. angustifolia* نسبت به داروی فلوکونازول بیش‌تر است.

Ankri و Mirelman با بررسی اثر مهاری عصاره‌های گیاهی تازه با استفاده از روش میکرودايلوشن براث بر گونه‌های کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا گالبراتا، کاندیدا کروزه‌ای به این نتیجه دست یافتند که روش میکرودايلوشن براث روشی مؤثر و دقیق برای تعیین مهار رشد قارچ‌ها است (۳). در تحقیق حاضر نیز مشخص شد که روش میکرودايلوشن براث نسبت به دیسک دیفیوژن برای محاسبه فعالیت ضدقارچی عصاره گیاهی برحسب غلظت عصاره، کارایی بیش‌تری دارد.

خاصیت ضد میکروبی گیاهان به‌طور عمومی به‌دلیل وجود ترکیب‌های فنولی، ساپونین، پلی‌ساکاریدها و فلاونوئیدهای موجود در ساختار آن‌ها است و برخی از این عوامل روی غشای پلاسمایی یا روی مهار آنزیم‌های ساختاری غشای سلولی میکروارگانیسم‌ها مؤثر است و می‌تواند خواص ضد میکروبی خود را اعمال نماید. تحقیقات فیتوشیمیایی گذشته اثرهای ضد میکروبی عصاره‌های مختلف را روی تعدادی از میکروارگانیسم‌ها بررسی کرده است (۲۸-۳۱). فعالیت ضد میکروبی پلی‌ساکاریدهای گیاه *E. angustifolia* شامل اکیناسئین، اکیناکوزید و آکینولون را می‌توان مشابه با آلیسین موجود در سیر دانست که با حضور بعضی از ترکیب‌های عمده مانند α -پپنین همراه با ترکیب‌های دیگر با مقدار کم‌تر مانند لینالول به‌شکل مشخصی فعالیت ضد میکروبی و باکتریواستاتیک آن تشخیص داده شده است (۳۴-۳۱). از طرفی گزارش شده است که خاصیت ضدقارچی با قطر هاله عدم رشد عصاره اتانولی بیش‌تر از عصاره آبی است (۳۵). با توجه به این‌که عصاره‌هایی با روش-ها و حلال‌های متفاوت از یک گیاه گرفته می‌شود، می‌تواند

در بیماری‌های قارچی کاندیدایی باشد. با این وجود ممکن است انتشار عصاره‌ی آبی در محیط کشت حاوی آگار با مشکل مواجه گردیده و یا در اثر ترکیب با مواد موجود در محیط کشت از اثر ممانعت کنندگی آنها کاسته شده باشد. با توجه به نتایج، عصاره اتانولی گیاه *E. angustifolia* در مقایسه با داروی فلوکونازول برای درمان عفونت‌های قارچی کاندیدایی مناسب می‌باشد. لذا مطالعات بیشتر در خصوص اثرهای ضد قارچی عصاره‌های گیاه *E. angustifolia* توصیه می‌شود.

اثرهای ضدقارچی متفاوتی از خود نشان دهند. عصاره اتانولی تهیه شده در این پژوهش نسبت به عصاره آبی اثر مهاری بیش‌تری را روی کاندیدا/آلبیکنس نشان داد. پژوهش‌های پیشین نشان می‌دهند که مواد ضد میکروبی موجود در گیاهان توسط حلال‌های آلی بهتر استخراج می‌شوند (۳۶). تصور بر این است که به احتمال آکالوئیدهای موجود در گیاه *E. angustifolia* در تماس با اتانول بهتر استخراج شده و به این ترتیب عصاره اتانولی قدرت بازدارندگی بیش‌تری دارد. از طرفی ممکن است انتشار عصاره آبی در محیط کشت حاوی آگار با مشکل مواجه گردیده و یا در اثر ترکیب با مواد موجود در محیط کشت از اثر ممانعت کنندگی آنها کاسته شده باشد. Li Dahui و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی فعالیت ضدقارچی عصاره ریشه *E. angustifolia* و تجزیه و تحلیل ترکیب‌های آن با استفاده از طیف‌سنجی جرمی کروماتوگرافی گازی (GC-MS) نشان دادند که عصاره ریشه *E. angustifolia* دارای فعالیت ضدقارچی قوی علیه *B. cinerea* با مقادیر EC50 و EC90 به ترتیب ۹۴۸ و ۱۸۶۹ میکروگرم در میلی‌لیتر، حداقل غلظت مهاری (MIC) ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت قارچ‌کشی (MFC) ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود (۳۷) از طرفی، ایجاد تغییرها در دیواره قارچ و اندامک‌های داخلی در اثر اسانس نیز نشان‌دهنده تأثیر ضد میکروبی این گیاه بوده و وجود ترکیب‌های ضد میکروبی در گیاه را تأیید کرد (۱۲).

Raho G و همکاران (۲۰۱۵) با بررسی اثرهای مهاری اسانس *E. angustifolia* در رشد پنج ارگانیسم بیماری‌زا: *Saccharomyces*, *Pseudomonas* Spp, *Coliform* Spp و *Zygosaccharomyces Bailii*, *Cerevisiae* و *Lactobacillus Plantarum* چنین گزارش کردند که این گیاه اثر باکتریواستاتیک ضعیفی در برابر برخی از مهم‌ترین علل عفونت ایجاد می‌کند که پتانسیل هیجان‌انگیزی در حرکت به سمت گزینه‌های طبیعی‌تر آنتی‌بیوتیکی برای آینده فراهم می‌کند (۳۲). در این تحقیق همسو با تحقیقات گذشته، ویژگی‌های ضدقارچی گونه گیاهی *E. angustifolia* علیه قارچ کاندیدا/آلبیکنس بررسی و نتایج نشان‌دهنده تأثیر مناسب عصاره این گیاه بر مهار رشد بود.

نتیجه‌گیری

مطابق با نتایج، به نظر می‌رسد که عصاره اتانولی *E. angustifolia* کاندید مناسبی برای جایگزینی فلوکونازول

1. Ghaddar, Nahed, et al. "Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida albicans* causing vaginal discharge among pregnant women in Lebanon." *BMC infectious diseases* 20.1 (2020): 1-9.
2. Rafiq, Naureen B. "Candidiasis." *StatPearls* [Internet] (2020).
3. Ankri S, Mirelman D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes Infect* 1999; 1(2):125-9.
4. Badiie, Parisa, and Zahra Hashemizadeh. "Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management." *The Indian journal of medical research* 139.2 (2014): 195.
5. Bidad F, Madani M, Masoumi M. Evaluation of Anticandidal Effects of *Allium saralicum*. *Qom Univ Med Sci J*. 2017; 11 (6) :10-18
6. Quindós, Guillermo, et al. "Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs." *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal* 24.2 (2019): e172.
7. Bellmann, Romuald, and Piotr Smuszkiewicz. "Pharmacokinetics of antifungal drugs: practical implications for optimized treatment of patients." *Infection* 45.6 (2017): 737-779.
8. Al-Baqsmi, Zahraa F., Suhail Ahmad, and Ziauddin Khan. "Antifungal drug susceptibility, molecular basis of resistance to echinocandins and molecular epidemiology of fluconazole resistance among clinical *Candida glabrata* isolates in Kuwait." *Scientific reports* 10.1 (2020): 1-10.
9. Berkow, Elizabeth L., and Shawn R. Lockhart. "Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective." *Infection and drug resistance* 10 (2017): 237.
10. Sharafutdinov, Irshad S., et al. "Increasing susceptibility of drug-resistant *Candida albicans* to fluconazole and terbinafine by 2 (5H)-furanone derivative." *Molecules* 25.3 (2020): 642.
11. Falahati Mehraban *, Fateh Ruhollah, Sharifi Nia Somayeh. Anti-candida effects of shallot extracts on the causes of chronic candidiasis. *Razi Medical Sciences (Journal of IranUniversity of Medical Sciences)*. October 2012, Volume 19, Number 100; from page 22 to page 28.
12. Furletti VF, Teixeira IP, Obando-Pereda G, Mardegan RC, Sartoratto A, Figueira G. M, et al. Action of *Coriandrum sativum* L. Essential Oil upon Oral *Candida albicans* Biofilm Formation. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011; 2011: 985832.
13. Anyanwu, Madubuike Umunna, and Rosemary Chinazam Okoye. "Antimicrobial activity of Nigerian medicinal plants." *Journal of intercultural Ethnopharmacology* 6.2 (2017): 240.
14. American Society of Health-system Pharmacists. *Herbal companion to AHFS DI.*, Bethesda, Maryland, USA, 2001; pp: 31-2.
15. Karsch-Völk, Marlies, et al. "E. angustifolia for preventing and treating the common cold." *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2 (2014).
16. De Sousa, Lourimar Viana Nascimento F., et al. "Isolation and identification of *Candida* species in patients with orogastric cancer: susceptibility to antifungal drugs, attributes of virulence in vitro and immune response phenotype." *BMC infectious diseases* 16.1 (2016): 1-12.
17. Tantasuwana, S., P. Chongtrakool, and M. Chayakulkeeree. "Impact of fluconazole disk diffusion susceptibility testing on management of Candidemia." *International Journal of Infectious Diseases* 101 (2020): 386.

18. Garmus, Tábata T., et al. "Ethanollic and hydroalcoholic extracts of Pitanga leaves (*Eugenia uniflora* L.) and their fractionation by supercritical technology." *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 36.2 (2019): 1041-1051.
19. Waikhom, Sayanika Devi, et al. "Prevalence of vulvovaginal candidiasis among pregnant women in the Ho municipality, Ghana: species identification and antifungal susceptibility of *Candida* isolates." *BMC pregnancy and childbirth* 20 (2020): 1-14.
20. Shahrokh, Somayeh, et al. "In vitro antifungal activity of aqueous-ethanolic extract of *Allium jesdianum* against fluconazole-susceptible and-resistant human vaginal *Candida glabrata* isolates." *Journal of Herbmmed Pharmacology* 6.4 (2017): 165-170.
21. Barani Karbasaki, Farzaneh, et al. "Evaluation of Antimicrobial effects of Aqueous and Alcoholic Extracts of Saffron on Oral Pathogenic Microbes (*Streptococcus Mutans*, *Lactobacillus*, *Candida Albicans*)." *Journal of Mashhad Dental School* 40.3 (2016): 203-212.
22. Sharifi-Rad, Mehdi, et al. "Echinacea plants as antioxidant and antibacterial agents: From traditional medicine to biotechnological applications." *Phytotherapy Research* 32.9 (2018): 1653-1663.
23. Bachir Raho, G., et al. "Inhibitory effects of *Echinacea angustifolia* essential oils on the growth of five pathogenic organisms: coliform spp, *pseudomonas* spp, *saccharomyces cerevisiae*, *zygosaccharomyces bailii* and *lactobacillus plantarum*." *International Journal of Advanced Research in Botany (IJARB)* 1.10 (2015).
24. Chiellini, Carolina, et al. "Preliminary data on antibacterial activity of *Echinacea purpurea*-associated bacterial communities against *Burkholderia cepacia* complex strains, opportunistic pathogens of Cystic Fibrosis patients." *Microbiological research* 196 (2017): 34-43.
25. Bagheri, Majid, et al. "A comparison between antifungal effect of *Fumaria officinalis*, *Echinacea angustifolia*, vinegar, and fluconazole against *Candida albicans* and *Candida glabrata* isolated from vagina candidiasis." *The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility* 17.136 (2015): 1-9.
26. Merali, S., et al. "Antifungal and anti-inflammatory activity of the genus *Echinacea*." *Pharmaceutical Biology* 41.6 (2003): 412-420.
27. Mir-Rashed, Nadereh, et al. "Disruption of fungal cell wall by antifungal *Echinacea* extracts." *Medical mycology* 48.7 (2010): 949-958.
28. Parham, Shokoh, et al. "Antioxidant, Antimicrobial and Antiviral Properties of Herbal Materials." *Antioxidants* 9.12 (2020): 1309.
29. Madani M, Khosravi AR, Shirani M. Comparison of the In vitro effect of different *Allium jesdianum* extracts on *Candida* spp. *J Biology Sci* 2010; 3(1):63-71. [Full Text in Persian]
30. Shirani M, Madani M, Khosravi AR, Hoseindoust SR. Evaluation of Antifungal activity of essential oil of *Allium jesdianum* on *Malassezia furfur* and *Candida Krusei*. *Jundishapour J Microbiol* 2013; Special Edition.
31. Hemeg, Hassan A., et al. "Antimicrobial effect of different herbal plant extracts against different microbial population." *Saudi Journal of Biological Sciences* 27.12 (2020): 3221-3227.
32. Bachir Raho, G., et al. "Inhibitory effects of *Echinacea angustifolia* essential oils on the growth of five pathogenic organisms: coliform spp, *pseudomonas* spp, *saccharomyces cerevisiae*, *zygosaccharomyces bailii* and *lactobacillus plantarum*." *International Journal of Advanced Research in Botany (IJARB)* 1.10 (2015).

33. Zorig, Anuu, et al. "Echinacea purpurea water extracts suppress the release of chemical mediators from mast cells." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (2021).
34. Teymourizadeh Zarir, et al. "Comparison of the effects of thyme extracts, turmeric, garlic and virginiamycin antibiotic on serum lipids, hematocrit percentage and hemoglobin level of broilers."(2020) 37-45.
35. Delahaye Ch, Rainford L, Nicholson A, Mitchell S, Lindo J, Ahmad M. Antibacterial and antifungal analysis of crude extracts from the leaves of *Callistemon viminalis*. *Med and biological sci.* 2009;3(1):1-7
36. Chalebian Firoozeh, Sharifnia Fariba, and Katozian Fatemeh. "Study of antimicrobial effects of methanolic, ethanolic and aqueous extracts of six species of Iranian *Papaver* on some pathogenic bacteria."(2019) 41-60.
37. Dahui, Li, Wang Zaigui, and Zhang Yunhua. "Antifungal activity of extracts by supercritical carbon dioxide extraction from roots of *Echinacea angustifolia* and analysis of their constituents using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)." *Journal of Medicinal Plants Research* 5.23 (2011): 5605-5610.