وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة كربلاء

كلية العلوم / قسم علوم الحياة

تأثير بعض المستخلصات النباتية الكحولية على خمائر *Candida* spp. المعزولة من الجهاز البولي التناسلي للنساء في مدينة كربلاء

رسالة مقدمة

الى مجلس كلية العلوم - جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير علوم في علوم الحياة

من قبل

نريمان حميد تركي

بكالوريوس علوم الحياة 2015

إشراف

أ.م.د. زهير حميد عبود

أ.د. مهند محسن أحمد

1443هـ 2021م

" يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ "

صَدَقَ أللهُ العَلِيُّ العَظِيْمُ

سورة المجادلة : الآية (11)

إقرار المشرف

اشهد بأن إعداد هذه الرسالة قد جرى تحت إشرافي في جامعة كربلاء بوصفها جزءاً من متطلبات نيل شهادة ماجستير علوم في علوم الحياة .

التوقيـع :

الاسـم : د. زهير حميد عبود

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

التاريـخ : / / 2021

التوقيع :

الاسـم : د. مهند محسن احمد

المرتبة العلمية : استاذ

التاريـخ : / / 2021

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوصيات أعلاه, أحيل هذه الدراسة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيـع :

الاسـم: د. خالد علي حسين

المرتبة العلمية : استاذ

العنـوان : رئيس قسم علوم الحياة

التاريـخ: / /2021

اقرار لجنة المناقشة

نحن اعضاء لجنة المناقشة ,نشهد باننا قد اطلعنا على هذه الرسالة الموسومة بـ **(تأثير بعض المستخلصات النباتية الكحولية على خمائر *Candida* spp. المعزولة من الجهاز البولي التناسلي للنساء في مدينة كربلاء)** وقد ناقشنا الطالبة (نريمان حميد تركي) في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتاريخ 2021/10/14 ونرى انها جديرة لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة بتقدير (امتياز) .

رئيس لجنة المناقشة

التوقيع :

الاسم : د. ماجد كاظم عبود

المرتبة العلمية : استاذ

مكان العمل : كلية العلوم / جامعة القادسية

التاريخ : / / 2021

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د. عهد عبد علي هادي

المرتبة العلمية : استاذ

مكان العمل :

الكلية التقنية ـ المسيب/جامعة الفرات الاوسط

التاريخ : / / 2021

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د. بان موسى حسن

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

مكان العمل :

كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2021

عضو اللجنة (مشرف)

التوقيع :

الاسم : د. زهير حميد عبود

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

مكان العمل : كلية العلوم / جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2021

عضو اللجنة (مشرف)

التوقيع :

الاسم : د. مهند محسن أحمد

المرتبة العلمية : استاذ

مكان العمل : كلية الطب / جامعة كربلاء

التاريخ : / /2021

مصادقة عميد كلية العلوم / جامعة كربلاء

التوقيع :

الاسم : د. جاسم حنون هاشم العوادي

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

التاريخ : / / 2021

شكر و تقدير

الحمد لله الذي علم بالقلم, علم الانسان مالم يعلم, الحمد لله المنان, الملك القدوس السلام , مدبر الليالي وألايام, مصرف الشهور وألاعوام, قدر الأمور فأجراها على أحسن نظام, ماشاء الله كان ومالم يشأ لم يكن, الحمد لله على ما أنعم به علي من فضله الخير الكثير والعلم الوفير وأعانني على إنجاز هذا العمل الذي احتسبه عبادة من العبادات جعلها الله خالصة لوجهه الكريم .

وبعد حمد الله تعالى وشكره على إنهائي لهذه الرسالة أتقدم بخالص الشكر وعظيم الامتنان لأستاذي الفاضل الدكتور زهير حميد والدكتور مهند محسن على ماقدموه لي من علم نافع وعطاء متميز وارشاد مستمر , وعلى مابذلوه من جهد متواصل ونصح وتوجيه من بداية مرحلة البحث حتى إتمام هذه الرسالة, ومهما كتبت من عبارات وجمل فإن كلمات الشكر تظل عاجزة عن إيفاء حقهما, فجزاهما الله عني خير الجزاء وجعل ذلك في موازين حسناتهما.

ويسرني أن أتقدم بالشكر الجزيل لعمادة كلية العلوم وبالخصوص الى السيد العميد د. جاسم حنون والسيد معاون العميد العلمي د . ازهر عبد الزهرة ولرئاسة قسم علوم الحياة .

كما أتقدم بأسمى عبارات الشكر و التقدير إلى الدكتور عبد عون الغانمي والدكتور حيدر القرعاوي لمساعدتهم لي في التحليل الاحصائي وأشكر الدكتور ابراهيم صالح الجبوري لمساعدته في تشخيص النباتات واتقدم بالشكر الجزيل الى كل من الدكتورة زمان والسيد احمد والسيد علاء في الشوون العلمية ؛ واتفضل بالشكر الجزيل الى الدكتورة بتول السلطاني و الدكتورة كوثر السعدي لمساعدتهما لي في جمع العينات السريرية .

كما أتقدم بالشكر والامتنان إلى منتسبي مختبر مستشفى الكفيل التخصصي واخص بالذكر السيد أبراهيم ، والسيد ميثم جعل الله ثمرة ذلك في ميزان حسناتهم.

ولكل من مد لي يد العون, أو أسدى لي معروف أو قدم لي نصيحة , أو كانت له إسهامه صغيرة أو كبيرة في إنجاز هذا العمل فله مني خالص الشكر والتقدير.

والحمد لله رب العالمين أولاً وآخرا, وظاهراً وباطناً, عدد خلقه ورضا نفسه وزنة عرشه ومداد كلماته, والصلاة والسلام على نبينا مُحَمَّد وعلى آله وصحبه أجمعين .

الباحثـــة

الاهداء

الى من وجوده حياة. . .ودعواته نجاة . . . . . وشيب شعره جنة وانفاسه رئة ثالثة . . .

الى ابي العزيز . . . .

الى من ساندتني في صلاتها ودعائها . . . . . الى اروع امرأة في الوجود . . .

الى امي الغالية . . . .

الى من جسد الحب بكل معانيه . . . . . .فكان السند والعطاء . . .الى من قدم لي الكثير . .

الى زوجي الحبيب. . . .

الى المحبة التي لا تنضب. . . . . والخير بلا حدود . .الى هدية الاقدار . . .

الى اخوتي واخواتي. . . .

الى العيون التي استمد منها القوة والاستمرار الى اعذب ما في عمري . . .

الى اطفالي نور الزهراء وحسنين

الى من رافقوني وشجعوا خطواتي عندما غالبتها الايام . . . . .كثر انتم لكم امتناني . . .

الى احبابي وبالخصوص مريم . . .

نريمان

الخلاصة

Summary

الخلاصة

نظراً للإصابات المتكررة بالفطريات وغيرها من الكائنات المجهرية لوحظ أنه في السنوات الأخيرة ازداد الاهتمام بالنباتات والأعشاب الطبية باستخدامها كمصادر رئيسية لإنتاج العقاقير الطبية أو كمصدر للمواد الفعالة التي تدخل في تركيب الدواء ، كما تستعمل كمادة خام لإنتاج بعض المركبات الكيميائية . وقد بينت الكثير من الدراسات أن المستخلصات النباتية لها تأثير فعال في علاج العديد من الإصابات الميكروبية المختلفة ، من بينها إصابات الفطريات كالمبيضات وغيرها وقد أعطت نتائج جيدة.

ان المبيضات هي من المسببات لإصابات الجهاز البولي والجهاز التناسلي للنساء الا ان الاستخدام المفرط لمضادات الفطريات ادى الى ظهور حالة المقاومة الدوائية لهذه المضادات . لذلك كان من المناسب البحث عن مضادات فطرية من مصادر طبيعية وذلك لعدة اسباب : رخصها و توفرها و قلة اعراضها الجانبية و ملائمتها للاستخدام .

تضمنت الدراسة الحالية جمع 75 عينة من حالات سريرية مختلفة ، وهي 50 عينة من المسحات المهبلية و 25 عينة ادرار للنساء في مدينة كربلاء المقدسة اللاتي يعانين من الالتهابات المهبلية والتهابات المجاري البولية.

بينت النتائج ان نسبة الاصابة الفطرية (موجبة النمو) في عينات المسحات المهبلية بلغت 60 % و كانت الاصابة غير الفطرية (سالبة النمو) بنسبة 40 % اما عينات الادرار فكانت نسبة الاصابة الفطرية 44 % تقابلها الاصابة غير الفطرية بنسبة 56 % .

سجلت النتائج في الدراسة الحالية ان *Candida albicans* بلغت اعلى نسبة تكرار في كل من *Candida glabrata* و *Candida tropical* و *Candida kefyr* في عينات الادرار و عينات المهبل بعدد عزلات 26 عزلة من اصل 41 عزلة وبنسبة 63.4 % .

بينت النتائج ان هناك عزلات لخميرة *C. albicans* كانت مقاومة للمضادات الفطرية ، فكانت هناك 7 عزلات مقاومة لمضاد فلوكونازول وعزلة واحدة مقاومة لكل المضادات الفطرية .

وقد أظهرت نتائج الدراسة الحالية بان استخدام التراكيز المختلفة من نبات البلوط (25 ، 50 ، 75 ، 100) ملغم / مل قد اعطت فاعلية تثبيطية جيدة وكان اعلى تأثير تثبيطي لنبات البلوط بتركيز 100 ملغم /

مل على جميع الخمائر المدروسة ، اذ كان معدل التثبيط 6.66 ملم على خميرة *C.albicans* في حين اظهر نفس التركيز معدل تثبيط اعلى 7.00 ملم على خميرة *C.glabrata* واقل منه كان على خميرة *C. tropicalis* بمعدل تثبيط 5.33 ملم ، في حين كان اقل معدل تثبيط والذي بلغ 4.33 ملم على خميرة *C.kefyr* .

اظهرت النتائج بان استخدام التراكيز المختلفة من نبات قشور الرمان (25 ، 50 ، 75 ، 100) ملغم / مل اما عند تركيز 100 ملغم / مل قد اعطت فاعلية تثبيطية عالية جدا واعلى من البلوط ، فقد كان معدل التثبيط 9.67 ملم على خميرة *C.albicans* المقاومة للمضادات في حين اظهر نفس التركيز معدل تثبيط اعلى 13.67 ملم على خميرة *C.glabrata* واقل منه كان على خميرة *C. tropicalis* بمعدل تثبيط 8.67 ملم ، في حين كان اقل معدل تثبيط والذي بلغ 6.33 ملم على خميرة *C.kefyr*.

اما عند مزج مستخلص البلوط مع مستخلص قشور الرمان اعطى فاعلية تثبيطية اعلى من البلوط وحده واقل من الرمان وحده لكل التراكيز المستخدمة على خميرة*C.albicans* المقاومة للمضادات الفطرية . اذ بلغت اعلى معدل تثبيط 8.66 ملم بتركيز 100 ملغم /مل .

كذلك بينت النتائج ان هناك تآزر واضح بين مستخلص قشور الرمان والمضاد الفطري الامفوترسين بي ، فعند خلط المستخلص بتركيز 100 ملغم / مل مع المضاد بتركيز 0.001 مايكروغرام / مل بلغ معدل التثبيط 18.33 ملم على عزلة خميرة *C.albicans* المقاومة للمضادات الفطرية وهذا يبين التازر العالي بين مستخلص قشور الرمان والمضاد الفطري الامفوترسين بي .

اما مستخلص اوراق الشاي الاخضر لم يعط اي فعالية تذكر بتركيز 100 ملغم / مل وكذلك بقية التراكيز و على جميع الخمائر المعزولة .

قائمة المحتويات

التسلسل	المحتويات	الصفحة
	المـــقدمـــة	1
	الفصل الاول :- استعراض المراجع	
1.1	المبيضات *Candida*	4
1.1.1	التصنيف Classification	4
2.1.1	الخصائص العامة General characteristics	5
2.1	داء المبيضات Candidiasis	6
3.1	داء المبيضات المهبلي Vulvovaginal Candidiasis	6
4.1	الامراضية Pathogenesis	8
5.1	انواع المبيضات Candida species	8
1.5.1	*Candida albicans*	8
2.5.1	*Candida glabrata*	9
3.5.1	*Candida tropicalis*	10
4.5.1	*Candida kefyr*	11
6.1	المضادات الفطرية الرئيسية Major Antifungal Drug	11
1.6.1	الازول Azole	12
2.6.1	البوليينات Polyenes	13
1.2.6.1	Amphotericin B	14
2.2.6.1	آلية العمل Mechanism of action of AmB	15
3.6.1	الاشنوكاندين Echinocandins	16
4.6.1	نضير البريميدين Pyrimidine anlogu	16
7.1	مقاومة العقاقير Drug Resistance	18

8.1	المستخلصات النباتية واستخداماتها ضد الفطريات Extracts and uses against fungi	20
1.8.1	نبات البلوط The oak plant	21
2.8.1	نبات الرمان The pomegranate plant	22
3.8.1	نبات الشاي الاخضر Green tea plant	22
	الفصل الثانـــي :- المواد وطرائق العمـــل	
1.2	الاجهزة و المواد المستخدمة	24
1.1.2	الأجهزة المستخدمة والشركات المصنعة لها	24
2.1.2	الأوساط الزرعية والشركات المصنعة لها	25
.3.1.2	المواد الكيميائية والشركات المصنعة لها	26
4.1.2	العدد kits	26
2.2	**طرائق العمل**	27
1.2.2	وسط سابرويد دكستروز اكار Sabouraud's Dextrose Agar	27
2.2.2	وسط Brain – Heart infusion broth	27
3.2.2	تشخيص العزلات الفطرية	28
4.2.2	المضادات الفطرية	29
3.2	النباتات المستخدمة في الدراسة	30
4.2	اختبار فاعلية النباتات المدروسة	30
1.4.2	مستخلصات النباتات الكحولية	31
2.4.2	التراكيز المستخدمة في التجربة	31
3.4.2	اختبار الفاعلية التثبيطية للمستخلصات النباتية على نمو المبيضات المدروسة	31
4.4.2	الفاعلية التآزرية للمستخلصين	32
1.5.2	تحضير المضاد الفطري AmB	32

2.5.2	دراسة الفعالية التآزرية لمستخلص قشور الرمان مع المضاد الفطري AmB	34
6.2	التحليل الاحصائي Statistical analysis	35
	الفصل الثالث :- النتائج والمناقشة	
1.3	عزل وتشخيص الخمائر	36
1.1.3	جمع العينات	36
2.1.3	التشخيص المظهري (الصفات الزرعية والمجهرية)	41
3.1.3	التشخيص بوساطة جهاز الفايتك	42
2.3	حساسية المبيضات للمضادات الفطرية	43
3.3	تأثير المستخلصات النباتية المختلفة على نمو خمائر المبيضات	44
1.3.3	تأثير المستخلص الكحولي لنبات البلوط على المبيضات	45
2.3.3	تأثير المستخلص الكحولي لقشور الرمان على المبيضات	49
3.3.3	تأثير مزج مستخلص قشور الرمان مع مستخلص البلوط على خميرة *C.albicans* المقاومة للمضادات الفطرية	53
4.3.3	تأثير مزج المستخلص الكحولي لقشور الرمان مع المضاد الفطري AmB على خميرة *C.albicans* المقاومة للمضادات الفطرية	55
5.3.3	تأثير المستخلص الكحولي لأوراق الشاي الاخضر على خمائر المبيضات	57
	الاستنتاجات و التوصيات	59-58
	المصادر	60
	الملاحق	92

قائمة الاشكال

رقم الشكل	العنـوان	رقم الصفحة
1-1	آلية عمل المضادات الفطرية	13
1-2	الاليات المحتملة لمقاومة الأدوية في أنواع المبيضات	19
3-1	نمو مستعمرات المبيضات على وسط SDA بعد 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 مْ	41
3-2	خلايا المبيضات تحت المجهر الضوئي بقوة 40 x	42
3-3	تأثير التداخل الثنائي لمستخلص البلوط على انواع *Candida*	47
3-4	تأثير مستخلص البلوط على خمائر *Candida*	48
3-5	تأثير التداخل الثنائي لمستخلص قشور الرمان على انواع *Candida*	51
3-6	تأثير مستخلص قشور الرمان على انواع *Candida*	52
3-7	تأثير التداخل بين المستخلصين على خميرة *C.albicans* في منطقة التثبيط (ملم)	54
3-8	تاثير التداخل بين المضاد الفطري AmB ومستخلص قشور الرمان على خميرة *C.albicans* في منطقة التثبيط(ملم)	56

3-9	1- يبين تأثير المستخلص الكحولي لقشور الرمان على خميرة *C. albicans* المقاومة للمضادات الفطرية 2- يبين التأثير التآزري للمستخلص الكحولي لقشور الرمان مع المضاد الفطري AmBعلى خميرة *C. albicans* المقاومة للمضادات الفطرية	57

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	رقم الصفحة
1-1	الأدوية الرئيسية المضادة للفطريات وأهدافها في الخلية	17
1-2	الاجهزة والأدوات المستخدمة في هذه الدراسة	24
2-2	الاوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة الحالية	25
3-2	المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة	26
4-2	العدد المستخدمة للتشخيص وفحص الحساسية	26
5-2	المضادات الفطرية المستخدمة في فحص الحساسية	29
6-2	النباتات المستخدمة في الدراسة	30
7-2	مزج التراكيز المختلفة من مستخلص قشور الرمان مع مستخلص البلوط	32
8 -2	عدد الانابيب وتركيز المضاد في كل انبوبة والنمو فيها	33
1-3	النسبة المئوية لعزلات خمائر Candida spp. المعزولة من المسحات المهبلية والادرار	37
2-3	النسبة المئوية للإصابة تبعا للعمر لعزلات خمائر Candida spp. المعزولة من المسحات المهبلية والادرار	38
3-3	النسبة المئوية للاصابة تبعا للحمل تبعا للعمرلعزلات خمائر Candida spp. المعزولة من المسحات المهبلية والادرار	39
4-3	النسبة المئوية للاصابة تبعا للحالة الاجتماعية لعزلات خمائر Candida spp. المعزولة من المسحات المهبلية والادرار	40
5-3	انواع المبيضات التي شخصت بنظام الفايتك ونسبة الاحتمالية لكل نوع	43
6-3	حساسية انواع المبيضات للمضادات الفطرية المختلفة	44
7-3	تأثير التراكيز المختلفة من مستخلص البلوط على انواع Candida والتداخل بينهما في منطقة التثبيط (ملم)	46

8-3	تأثير التراكيز المختلفة من مستخلص قشور الرمان على انواع Candida والتداخل بينهما في منطقة التثبيط	50
9-3	التداخل بين مستخلص قشور الرمان ومستخلص البلوط في منطقة التثبيط (ملم) لخميرة *C.albicans* المقاومة للمضادات الفطرية	53
10-3	التداخل بين مستخلص قشور الرمان والمضاد الفطري AmB لخميرة C. albicans في منطقة التثبيط	55

قائمة المختصرات

الكلمة	المختصر
Candida	C.
Sabouraud dextrose agar	SDA
Secreted aspartyl proteinases	SAPs
Vulvovaginal Candidiasis	VVC
Recurrent Vulvovaginal Candidiasis	RVVC
Heat shock proteins	HSP
Minimum inhibitory concentration	MICs
Species	spp.
Epigallocatechin	EGC
Epicatechin	ECC
Epigallocatechin Gallate	EGCG
Epicatechin Gallate	ECCG
Fluconazole	FLZ
Voriconazol	VCZ
Caspofugin	CASP
Micafugin	MCF
Amphotericin B	AmB
Flucytosine	5-FC
Dimethyl sulfoxide	DMSO

المقدمة

Introduction

المقدمة

تعد الفطريات اكثر الكائنات الحية انتشاراً في معظم البيئات، وتنقسم على اعفان (Molds) و خمائر (Yeasts) . الخمائر كائنات حية أحادية الخلية تتكاثر بالتبرعم، ويوجد منها عدة أنواع ؛ انواع منها نافعة للإنسان واخرى مرضية مثل : جنس المبيضات *Candida* . و يعد جنس المبيضات اكثر انتشاراً لامتلاكه عدة عوامل ضراوة ؛ والتي تؤدي الى احداث اصابات داخلية في القناة التنفسية ، والهضمية ، و قناة المجاري البولية و التناسلية . فضلا عن دخولها في بعض الحالات الى مجرى الدم (Dota *et al.* , 2011 ; Mahmoudabadi *et al.* , 2013) .

يبلغ عدد المبيضات حوالي 150 نوعا ، تتضمن 20 نوعا مرضية للإنسان ، وان 90 % من الاصابات تسببها المبيضات البيضاء (*C.albicans*) ، كما توجد انواع اخرى مرضية مثل : *C. glabrata* و *C.krusi* و *C. tropicalis* و *C. parapsilosis* (Papon *et al.*, 2013) .

ان زيادة حدوث الاصابة بالمبيضات تعود الى اسباب عديدة منها: ضعف المناعة بسبب الاصابة بفيروس العوز المناعي البشري (Human immunodeficiency virus) ، والاستعمال الطويل للأدوية المثبطة للمناعة وزرع الاعضاء . وتصيب الاطفال حديثي الولادة و كبار السن ايضا (Chu *et al.*, 2006) . و تشكل الإصابة التي تسببها المبيضات عبئا ثقيًلا على الصحة العامة . (Liu *et al.*, 2017)

ان الآلية المرضية لأنواع المبيضات غير مفهومة بشكل جيد ، كما أن معدل الإصابة بالأمراض يتزايد بسرعة . علاوة على ذلك ، أدت الزيادة في مقاومة مضادات الفطريات التقليدية الحاجة الى السيطرة على اصابة المبيضات عن طريق التشخيص المبكر والوقاية من داء المبيضات (Pfaller *et al* ., 2013).
المبيضات ، هي جزء من النبيت الطبيعي في جسم الإنسان ، التي تستعمر مواقع تشريحية مختلفة مثل : تجويف الفم ، والجهاز الهضمي ، والمهبل والجلد (Seneviratne *et al.* , 2008) في الحالات التي يكون فيها ضعف في المضيف ، أو عندما يكون هناك تغيير في البيئة المحيطة يعزز نمو المبيضات ، يؤدي ذلك إلى الاصابة بداء المبيضات (Candidiasis) (Gow *et al.*, 2012) .

هناك عدة أنواع من داء المبيضات بما في ذلك داء المبيضات الغشاء المخاطي (mucosal candidiasis) ، وداء المبيضات الجلدي (cutaneous candidiasis) ، وداء المبيضات الجهازي (systemic candidiasis) . المبيضات تتحول من حالة التعايش غير الممرض إلى الممرض الذي يسبب المرض ويعتمد ذلك على الجهاز المناعي للمضيف وعوامل الضراوة للمبيضات (Yang , 2003).

تُعزى الإمراضية لأنواع المبيضات إلى عوامل ضراوة معينة ، مثل القدرة على تجنب دفاعات المضيف ، والالتصاق (Adherence) ، وتكوين الأغشية الحيوية (Biofilm formation) على أنسجة المضيف وعلى الأجهزة الطبية وإنتاج إنزيمات تحلل الأنسجة مثل انزيم البروتييز (Proteases) ، و الفوسفولاييز (Phospholipases) و الهيمولايسين (Hemolysin) (Silva *et al*., 2012) .

استعملت العديد من المضادات الفطرية ضد امراض المبيضات و من بين المضادات الفطرية المتاحة مركبات الازول (Azole) ، تعد الأزولات هي الأدوية المفضلة والأكثر استخدامًا لعلاج اصابة المبيضات ، اعتمادًا على نوع الاصابة ، والموقع التشريحي الذي تحدث فيه وملف حساسية الأنواع ، ويمكن أيضًا استخدام مضادات الفطريات الأخرى مثل البوليينات (Polyenes) ، و الاشنوكاندين (Echinocandins) ، نظائر البريميدين (Pyrimidine analogue) و الأليلامين (Allylamines) . (Pfaller *et al* ., 2013 ; Pappas *et al* ., 2016)

غالبًا ما يُفضل الفلوكونازول (FLZ) ، وهو نوع من الآزول ، في علاج اصابة المبيضات بسبب انخفاض تكلفته وقلة سميته ، بالإضافة إلى توافره في تركيبات متنوعة . ومع ذلك هناك العديد من الدراسات حول تطور المقاومة بين أنواع المبيضات ، خاصة فيما يتعلق بالأزولات ، وهو أمر ضروري لتحديد آليات المقاومة التي تبديها الفطريات بهدف تطوير فئات جديدة من مضادات الفطريات لعلاج اصابة المبيضات .(Pappas *et al* ., 2016)

ان من أكبر التحديات الحالية في علاج الأمراض الفطرية هي المقاومة التي اكتسبتها الفطريات لمركبات معينة . و هذا يتطلب استخدام عقاقير جديدة لعلاج الاصابة بالأمراض التي تسببها الفطريات (Bastos *et al.* , 2011 ; Newman & Cragg , 2016) .

كان استخدام المنتجات الطبيعية مصدرًا مهمًا في اكتشاف عقاقير جديدة في هذا المجال (Newman & Cragg 2016 ; Biasi-Garbin *et al.* 2016) . أذ اكدت دراسات عديدة استخدام النباتات من قبل السكان المحليين في علاج الإصابة بالأمراض التي تسببها الفطريات (Maregesi *et al.* 2008; Svetaz *et al.* 2010; Bastos *et al.* 2011; Violante *et al.* 2012).

ان البحث عن بدائل للعلاج الأولي أو التكميلي للإصابة التي تسببها المبيضات مستمرًا . و في هذا السياق ، تسمح المنتجات المشتقة من النباتات باكتشاف عوامل جديدة مع إمكانية تطبيقها سريريا وفي تطوير الأدوية للاستخدام الجهازي و / أو الموضعي (Asong *et al.*, 2019).

الهدف من الدراسة :

تهدف الدراسة الحالية الى دراسة المقاومة في خمائر *candida* المعزولة من الجهاز البولي و التناسلي للنساء في كربلاء ومعرفة تأثير المستخلصات النباتية المحضرة في المختبر على العزلات , وقدرتها على تثبيط نمو هذا المبيضات ؛ من خلال :

1- عزل وتشخيص الخمائر المعزولة من النساء اللاتي يعانين من الالتهابات المهبلية والتهابات المجاري البولية .
2- الاستخلاص الكحولي بالإيثانول للبلوط وقشور الرمان واوراق الشاي الاخضر .
3- اختبار فاعلية المستخلصات النباتية على الخمائر المعزولة *Candida glabrata* و *Candida tropicals* و *Candida kefyr* و *Candida albicans* .

الفصل الأول

استعراض المراجع

Literatures Review

1. استعراض المراجع Literature Review

1.1. المبيضات Candida

هي خمائر واسعة الانتشار عزلت بشكل واسع من البيئة (Calderone , 2002) . يعد جنس المبيضات من الممرضات الانتهازية حقيقية النواة ، والتي توجد بشكل نبيت طبيعي للإنسان في التجويف المخاطي للفم والقناة المعدية المعوية والمهبل (Lim *et al*., 2012 ; Shao *et al*., 2007 ; Kim & Sudbery, 2011).

المبيضات لديها القدرة على التسبب بالإصابات السطحية والجهازية المختلفة عندما تضعف مقاومة العائل للإصابة موضعيًا أو جهازيًا ، والظهور السريري الأكثر شيوعًا هو داء المبيضات السطحي ، بما في ذلك داء المبيضات الجلدي والفموي البلعومي (cutaneous and oropharyngeal candidiasis) و الالتهابات المهبلية (vulvovaginitis) . أفادت الدراسات الاستقصائية الوبائية الشاملة أن الاصابة بسبب المبيضات تمثل ما يقارب من 75 - 88 ٪ من جميع الاصابات الفطرية الغازية في المستشفيات (Perlroth *et al.* , 2007) .

1.1.1. التصنيف Classification

المبيضات تصنف كخمائر و تابعة الى شعبة الفطريات الكيسية (Lumbsch and Huhndorf , 2007) .

Kingdom………..…*Eumycota*

Phylum……..………... *Ascomycota*

Sub-phylum………………..*Ascomycotina*

Class…..……………………...*Ascomycetes*

Order…..…………………….............*Saccharomycetales*

Family....…………………..………….. *Saccharomycetaceae*

Genus…..…………..……………..……..….. *Candida*

من المعروف أن حوالي 20 نوعًا تصيب الانسان ، ومن الأمثلة على هذه الأنواع هي :

C. albicans, و *C. glabrata,* و *C. parapsilosis,* و *C. tropicalis,* و *C.guilliermondii*

C. lusitaniae و *C. krusei,* و *C. dubliniensis,* و *C. pelliculosa,* و *C. kefyr* و

C. norvegensis, و *C. haemulonii* (Moris, *et al.*, 2008; Aittakorpi, *et al.*, 2012).

2.1.1. الخصائص العامة General characteristics

المبيضات توجد في الغالب بشكل وحيدة الخلية ، يبلغ قطرها (4-6 ميكرومتر)، بيضوية الشكل وتتكاثر عن طريق التبرعم (Edwards , 2000) . تظهر المبيضات على وسط السابررويد دكستروز اكار (SDA) بشكل مستعمرات كريمية ناعمة ومحدبة وتصبح بشكل مجعد فيما اذا تركت فترة طويلة في الحاضنة (Lynch,1994) . يستخدم وسط السابرويد دكستروز اكار على نطاق واسع في وسائل العزل الأولية للمبيضات من العينات السريرية (Odds, 1991).

المبيضات تعود الى شعبة الفطريات الكيسية (phylum Ascomycota). يخضع معظم أعضاء هذه الجنس لتحول شكلي قابل للانعكاس من الشكل الخميري إلى الشكل الخيطي (الهايفا Hypha) ، ويحدث هذا التحول في ظل الظروف البيئية العكسية أو أثناء الاصابة الممرضة في المضيف البشري (Geiger *et al*., 2004 ; Inglis *et al*., 2013) .

ان تزايد عدد المرضى الذين يعانون من نقص المناعة والذين يستخدمون القسطرة الوريدية ، والتغذية الوريدية الكاملة ، و أدوات الجراحة والاستخدام المتزايد للمضادات الحيوية واسعة الطيف والعلاجات الكيميائية السامة للخلايا وعمليات زرع الأعضاء ، هي عوامل أسهمت في زيادة الاصابة بالمبيضات (Ortega *et al*. , 2011) . المبيضات لديها القدرة على التعايش وإصابة العديد من المواقع المختلفة تشريحيًا ، الأمر الذي يتطلب التكيف مع مجموعة متنوعة من الضغوط البيئية المختلفة ، وقد تمت دراسة عوامل الضراوة التي تسهل استعمار أنسجة العائل والغزو بشكل أساس بين *C. albicans* وتشمل تكوين الخيوط (التشكل Morphogenesi) ، والتعبير عن جزيئات التعرف على السطح (اللاصقات Adhesins) ، والتحول الظاهري (Phenotypic switching) ، وإنتاج إنزيم التحلل المائي خارج الخلية (Secreted Aspartyl Proteinases (SAPs) and phospholipases)

. (Calderone and Fonzi , 2001 ; Soll , 2002 ; Naglik *et al.* , 2003)

تختلف مسارات تحويل الإشارة التي تحكم الضراوة اعتمادًا على نوع الاصابة (على سبيل المثال ، الاصابة المخاطية أو الاصابة الجهازية) , (Park *et al.* , 2005) وموقع ومرحلة الاصابة (Hube , 2004) ، وطبيعة استجابة المضيف (Romani *et al.* , 2003) .

2.1. داء المبيضات Candidiasis

تعد الاصابات الفطرية مشكلة صحية خطيرة ، خاصة لدى الأشخاص الذين يعانون من ضعف الجهاز المناعي ، وهي احد الاسباب للإصابة بالأمراض وتزايد اعداد الوفيات في جميع أنحاء العالم (Vallabhaneni *et al.* , 2016) . في العقدين الماضيين ، أظهرت الاصابات الفطرية زيادة كبيرة ارتبطت هذه الزيادة بعوامل مثل : ازدياد في عدد المرضى الذين يعانون من ضعف في الجهاز المناعي

.(Ortega *et al.*, 2010 ; Junqueira *et al.* , 2012 ; Li *et al.* , 2013 ; Terças *et al.*, 2017)

أكثر الأمراض الفطرية شيوعًا التي تصيب السكان في العالم هو داء المبيضات (Candidiasis) Lewis *et al.*, 2012 ; Ferreira *et al.*, 2013 ; Kwamin *et al.*, 2013 ; Tsai *et al.*, 2013); Vázquez - González *et al.* , 2013) . في الحقيقة أن داء المبيضات هو اصابة يمكن أن تؤثر على الأشخاص الذين يعانون من نقص المناعة والأشخاص الأصحاء (Raman *et al.*, 2013) .

3.1.داء المبيضات المهبلي Vulvovaginal Candidiasis

داء المبيضات المهبلي (VVC) هو اصابة تصيب الغشاء المخاطي المهبلي و / أو الفرجي بسبب أنواع المبيضات. المبيضات البيضاء (*C.albicans*)هي اكثر الأنواع شيوعًا توجد بنسبة 80 - 95 % ، وأنواع المبيضات غير البيضاء (Non-Albicans Candida) التي يمكن أن تسبب VVC بنسبة 10 - 20 % هي *Candida glabrata* . يمكن أن يكون داء المبيضات المهبلي بأعراض او بدون أعراض. المبيضات بشكل أبواغ (Blastoconidia) عادة ما تميل إلى أن تكون بدون أعراض ، لكن الخمائر الناشئة بشكل خيوط (Hypha) غالبًا ما تسبب التهاب المهبل المصحوب بأعراض (Arfiputri *et al.*, 2018) .

تسمى الاصابة الأولى التي تحدث في المهبل التهاب المهبل (Vaginitis)، ويمكن أن تمتد إلى الفرج (التهاب الفرج Vulvitis) . حوالي 70- 75 ٪ من النساء يصبن بـ VVC مرة واحدة على الأقل خلال حياتهن ، معظمهن في سنوات الإنجاب (20 - 40 سنة) وحوالي 50 ٪ تميل إلى تكرار الإصابة أو نوبة ثانية من الاصابة . حوالي 5 – 10 ٪ من النساء البالغات يعانين من VVC المتكرر والذي يعرف على أنه أربع نوبات أو أكثر كل سنة من VVC المصحوب بأعراض والمعروف باسم داء المبيضات الفرجي المهبلي المتكرر (Recurrent Vulvovaginal Candidiasis) (RVVC) . ان أعراض داء المبيضات المهبلي الشائعة هي الألم في منطقة المهبل ، والتهيج المهبلي ، و الحرقة ، و عسر الجماع ، و عسر البول ، و التي تسبقها حكة حادة وإفرازات مهبلية (Arfiputri *et al.* , 2018 ; Goncalves *et al.* , 2016) .

على وفق الدراسات الوبائية ، تم الإبلاغ عن المعدل الأعلى للإصابة عن طريق الدراسات الوبائية التي أجريت في البلدان الأفريقية ، مثل : نيجيريا (57.3 ٪) ، وتونس (48.0٪) ، تليها البرازيل (47.9٪) وأستراليا (30.5٪) . تم الإبلاغ عن المعدل الأدنى في البلدان الأوروبية ، مثل اليونان (12.1٪) وإيطاليا (19.5٪) . هناك العديد من أنواع المبيضات ، التي يمكن أن تسبب VVC ، مثل *Candida albicans* ، و *Candida glabrata* ، و *Candida tropicalis* ، و *Candida parapsilosis* ، و *Candida krusei* (Goncalves *et al.*, 2016) .

اكثر الأنواع التي تم تحديدها في النساء المصابات بـ VVC كانت المبيضات البيضاء (*C. albicans*) ، تليها *C . glabrata* . أثناء الفحص ، يمكن العثور على نوع واحد أو أكثر من أنواع المبيضات. عادة ما يتم الحصول على اصابة مختلطة بين *C. albicans* مع *C. glabrata* (Goncalves *et al.*, 2016 ; Dovnik *et al.*, 2015) .

يمكن تقسيم عوامل تحفيز الاصابة لداء المبيضات المهبلي على قسمين ، مثل : عوامل المضيف والعوامل السلوكية . تشمل عوامل الاصابة المتعلقة بالمضيف هي الحمل ، واختلال الهرمونات ، وداء السكري غير المنضبط ، والتثبيط المناعي ، واستخدام المضادات الحيوية والتأثيرات الوراثية . وفي الوقت نفسه ، تشمل عوامل الاصابة السلوكية لـ VVC استخدام موانع الحمل والنظافة الشخصية والسلوك الجنسي وأيضًا الملابس المستخدمة (Zeng *et al.*, 2018 ; Dovnik *et al.*, 2015) .

4.1. الامراضية Pathogenesis

يلعب جدار خلية الخميرة دورًا مهمًا في الضراوة ؛ لأنه الجزء الذي يلتصق مباشرة مع خلايا المضيف. المبيضات لا تلتصق بالغشاء المخاطي فحسب ، بل تخترقه أيضًا. عن طريق التحوير المناعي والالتصاق ، يمكن أن تغزو المبيضات خلايا المضيف. التحوير المناعي هو قدرة المبيضات على تعديل الجهاز المناعي للمضيف في شكل تحفيز لزيادة أو تقليل رد الفعل المناعي للمضيف . هناك العديد من المكونات الموجودة في جدران الخلايا التي تلعب دورًا في عملية تعديل الجهازالمناعي ، مثل : الكايتين (Chitin) ، و الكلوكان (Glucans) والبروتينات المانوية (Mannoproteins) . تؤدي الاستجابة المناعية إلى إنتاج عدد من البروتينات المعروفة باسم بروتينات الصدمة الحرارية (HSP) ، والتي تلعب دورًا في تحفيز الاستجابة المناعية وعملية نمو المبيضات . الخطوة الأولى للاستعمار هي الالتصاق ، اذ تلتصق المبيضات بخلية المضيف عن طريق التفاعلات الكارهة للماء . هذا يقلل من مستوى إزالة الفطريات من الجسم عن طريق تنظيم المناعة الطبيعي . عندما تخترق المبيضات البيضاء (*C. albicans*) سطح الغشاء المخاطي للمضيف ، يتغير الشكل الفطري من الابواغ (Spores) إلى الخيوط الكاذبة (Pseudohyphae) ، الذي سيطلق العديد من الإنزيمات المحطمة مثل : البروتينيز (Proteinases) ، وبروتينيز الأسبارتيك (Aspartic proteinases) ، و الفوسفولايبيز (Phospholipases) ، مما يؤدي إلى مساعدة الخميرة على غزو أنسجة المضيف (Cassone , 2015 ; Goncalves *et al.*, 2016) .

5.1. انواع المبيضات Candida species

Candida albicans .1.5.1

تعد *C. albicans* هي العامل الأكثر شيوعًا المسبب للإصابة المخاطية والاصابة الجهازية من بين كل الانواع ، وهي مسؤولة عن حوالي 70 ٪ من الاصابة الفطرية حول العالم (Morad *et al.*, 2018). وهي جزء من النبيت الطبيعي في حوالي 50 ٪ من البشر (Nobile and Johnson , 2015) . توجد في القناة الهضمية وتجويف الفم و القناة التناسلية للأفراد الاصحاء (Mason *et al.*, 2012 ; Liu *et al.*, 2013) .

ان *C. albicans* كانت السبب الرئيسي للإصابة الغازية التي تهدد الحياة على مدى العقود العديدة الماضية. على الرغم من العلاج ، فإن معدل الوفيات يقترب من 40 ٪ ، خاصة في ظروف المستشفى . (Chen *et al.* , 2020 ; Basmaciyan *et al.* , 2019)

اعتمادًا على مدى الضراوة ، ينشأ المرض ، والذي يكون اما بطبيعة حادة او مزمنة (Naglik *etal.* , 2008; Pirofiski and Casadevall, 2009; Mathe and Van Dijck , 2013) نتيجة لذلك ، تم تمييز اصابات *C. albicans* بوصفها تحديًا خطيرًا للصحة العامة مع أهمية سريرية و اقتصادية عالية ، و تمثل أحد أكثر العوامل انتشارًا التي تم تحديدها في اصابات المستشفى . (Filioti *et al*., 2007 ; Perlroth *et al*., 2007 ; Pfaller and Diekema , 2007)

Candida glabrata .2.5.1

تعد خميرة *C. glabrata* من اهم انواع المبيضات من حيث امراضيتها بعد *C. albicans* وتتميز بعدم قدرتها على تكوين خيوط فطرية كاذبة (Psaudohypha) ، وليس لها القدرة على التحول الثنائي (Dimorphic) الا انها تكون ابواغ برعمية (Blastospore) وتتميز مستعمراتها بأنها ملساء ناعمة وذات لون أبيض كريمي (Lipperheide *et al.* , 2002) .

ان *C. glabrata* احد الاسباب المرضية الفطرية التي تهدد حياة المرضى وتسبب المزيد من المشاكل في المستشفيات بسبب إظهارها مقاومة ذاتية للأدوية المضادة للفطريات (Timmermans *et al.* , 2018 ; Risan , 2016) . وهي جزء من النبيت الطبيعي في الفم ، و الجهاز الهضمي والمهبل ، وفي معظم الأشخاص لا تسبب المرض (Rodrigoues *et al.* , 2014 ; Bialkova and Šubík , 2006) .

مع ذلك يبدو أن الاضطرابات في البيئة الطبيعية ؛ تؤدي إلى أن تصبح *C. glabrata* سببا للمرض خاصة في المضيف المثبط مناعيا (Riera *et al.* , 2012 ; Rodrigues *et al*., 2014) . علاوة على ذلك ، لاحظ أنه نظرًا لارتفاع مقاومة المضادات الحياتية ، والعدد المحدود من العلاجات الفعالة للأدوية المضادة للفطريات المتاحة حاليًا ، يمكن أن تُعزى الإمراضية لـ *C. glabrata* إلى قدرتها على تكوين الأغشية الحيوية (Biofilm) ومقاومتها العالية نسبيًا للعلاجات التقليدية المضادة للفطريات .(Bialkova and Šubík , 2006)

عند المقارنة *C. glabrata* مع *C. albicans*، هناك اتفاق على أن الاختلاف الوظيفي الرئيسي بينهما هو عدم قدرة *C. glabrata* على تكوين خيوط حقيقية وإفراز بعض البروتييز (Desai *et al.* , 2011) .

Candida tropicalis .3.5.1

توجد *C.tropicalis* منتشرة على نطاق واسع في الطبيعة وهي مستعمر شائع للجلد وتجويف الفم والجهاز الهضمي (Singh *et al.* , 2020) . علاوة على ذلك ، يعد نوع *C.tropicalis* من أنواع المبيضات الانتهازية المهمة التي يمكن أن تسبب الاصابة في المستشفيات ، ومعدل عزلها يأتي في المرتبة الثانية بعد المبيضات البيضاء(*C. albicans*) (Zuza-Alves *et al.* , 2017) .

تظهر مستعمرات *C.tropicalis* على وسط SDA ذات لون ابيض إلى كريمي ، مع ملمس كريمي ومظهر ناعم وقد يكون لها حواف مجعدة قليلاً (Kurtzman *et al.* , 2011) . المرضى المصابين ب *C.tropicalis* قد يعانون من اصابات داخل البطن و في الرئة ، والجهاز البولي التناسلي ، و كذلك يعانون من اصابة جهازية (Cuervo *et al.* , 2017 ; Bassetti *et al.* , 2017 ; Dermawan *et al.* , 2018) .

الأهم من ذلك ، اكتشفت الدراسات السابقة زيادة في مقاومة *C. tropicalis* للعقاقير في السنوات الأخيرة . أظهر تقرير المراقبة العالمية لمضادات الفطريات SENTRY في عام 2013 أن معدل مقاومة *C. tropicalis* للفلوكونازول كان 11.60٪ في 31 دولة إجمالاً (Castanheira *et al.* , 2016) علاوة على ذلك ، أظهرت البيانات المأخوذة من شبكة مراقبة مقاومة الفطريات الصينية (CHIF-NET) أن معدل مقاومة *C.tropicalis* للفلوكونازول ارتفع من 11.20٪ في عام 2009 إلى 42.70 ٪ في عام 2014 (Fan *et al.* , 2017) .

لذلك ، تسببت عوامل الضراوة في *C.tropicalis* ، التي تتضمن النمط الجيني للسلالات المقاومة للأدوية ، وآلية مقاومة الأدوية ، في إثارة قلق واسع النطاق في السنوات الأخيرة (Arastehfar *et al.* , 2020) .

Candida kefyr .4.5.1

خميرة معزولة أحيانًا من منتجات الألبان (Karstrup *et al.* , 2017 ; Fonseca *et al.* , 2008) ، عزلت أيضًا من مجموعة متنوعة من العينات السريرية ومن أيدي العاملين في مجال الرعاية الصحية (Diba *et al.* , 2018 ; de Paula Menezes *et al.* , 2018 ; Hamzavi *et al.* , 2019 ; Khan *et al.* , 2015 ; Pfaller *et al.* , 2019) .

تشير التقارير الأخيرة إلى أن خميرة *C. kefyr* هي أحد مسببات الأمراض الناشئة في المرضى الذين يعانون من نقص المناعة ، وخاصة أولئك الذين يعانون من أمراض أورام الدم (Pfaller *et al.* , 2019 ; Direkze *et al.* , 2012 ; Reuter *et al.* , 2005 ; Dufresne *et al.* , 2014 ; Jung *et al.* , 2015) .

جذبت *C.kefyr* الانتباه نظرًا لانخفاض حساسيتها للتأثر بالمضاد الفطري AmB (Dufresne *et al.* , 2014 ; Pfaller *et al.* , 2004 ; Zepelin *et al.* , 2007 ; Wang *et al.* , 2015 ; Barchiesi *et al.*, 1999) . وقدرتها على اكتساب مقاومة لمضادات الإشنوكاندين بسرعة (Fekkar *et al.* , 2013 ; Staab *et al.* , 2014).

6.1. المضادات الفطرية الرئيسية Major Antifungal Drug

تستخدم كل فئة من فئات مضادات الفطريات وسائل مختلفة لقتل أو تثبيط نمو مسببات الأمراض الفطرية (Pfaller , 2012 ; Kanafani and Perfect , 2008) . تعتمد طريقة علاج داء المبيضات على حالة المريض ، وموقع الاصابة وشدتها . بالإضافة إلى السيطرة المناسبة على مصدر الاصابة ، قد تكون تعقيم الأجهزة الطبية الملوثة و مضادات الفطريات المناسبة مهمة في علاج الاصابة الفطرية (Pappas *et al.* , 2016) .

من أجل العلاج الفعال للإصابة المخاطية السطحية والأمراض الفطرية الجهازية التي تهدد الحياة ، تم تطوير عدد كبير جدًا من الأدوية المضادة للفطريات واستخدامها للأغراض السريرية . تستخدم مضادات الفطريات بشكل واسع في العلاج والوقاية من معظم الاصابات الفطرية ؛ ويمكن تقسيمها على اربع مجموعات رئيسية هي : البولينات (Polyenes) ، والازولات (Azoles) و

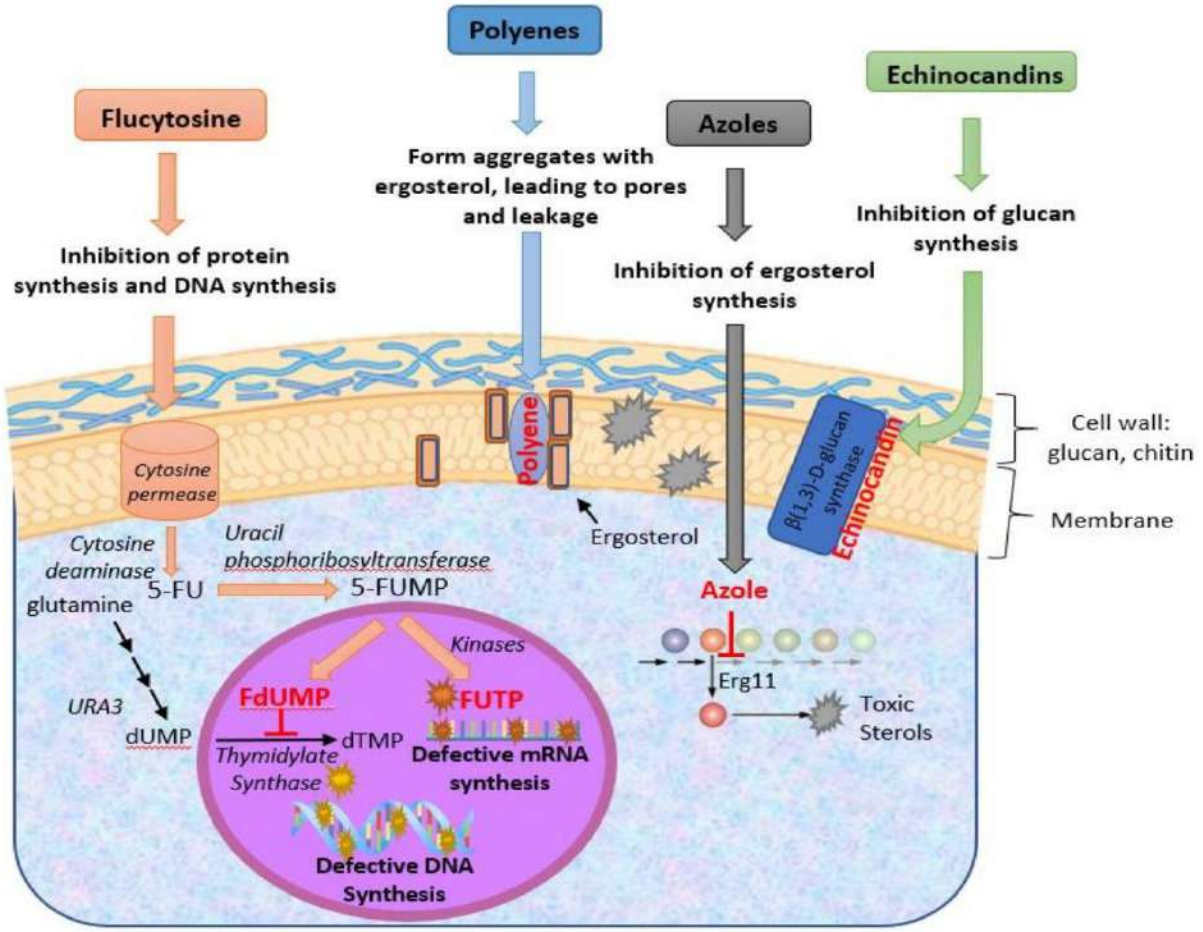
نظائر البريمدين (Pyrimidine analogues) والاشنوكاندين (Echinocandins) (Carmona and Limper , 2017) و كما موضح في الجدول (1-1) .

1.6.1.الازول Azole

مضادات الآزول هي واحدة من أكثر فئات الأدوية شيوعًا المستخدمة لعلاج الاصابة بالمبيضات في جميع أنحاء العالم لكل من الاصابات المخاطية والجهازية. وأدخلت مشتقات الآزول كمضادات الفطريات في عام 1960 م وهي الاكثر توسعا (جدول 1-1) (Fromtling , 1988 ; Yao *et al.* , 2007) .

معظم مشتقات الآزول هي مثبطة لنمو الفطريات و ذات طيف واسع ضد الخميرة و الاعفان ، وتستهدف هذه المضادات المسار الحيوي لتخليق الإرغوستيرول (Ergosterol) ؛ وبالتالي تمنع نمو الفطريات (Borgers , 1980 ; Lamb *et al.* , 1999 ; Perfect , 2017 ; Van Daele *et al* . , 2019). الإرغوستيرول (Ergosterol) : هو المكون الرئيسي لغشاء الخلية الفطرية ويعمل كمنظم حيوي للحفاظ على السيولة و السلامة المطلقة لغشاء الخلية (Ghannoum and Rice , 1999 ; Akins , 2005).

بالتحديد الازولات تمنع تصنيع الارغوستيرول عن طريق تثبيط إنزيم lanosterol 14 α - demethylase وكما موضح في الشكل (1-1) . الفعالية القاتلة للازولات ضد الفطريات والطيف الواسع جعلت علاج الآزولات من الخط الأول لعلاج و / أو الوقاية من العديد من الاصابات الفطرية الغازية . يتوفر العديد من الأزولات بشكل ملائم في شكل تركيبات وريدية وفموية. لا يقتصر تثبيط الازول على إنزيم الخلايا الفطرية ، بل يرتبط الازول بتثبيط السايتوكروم P450 (Cytochrome P 450) ؛ الذي يؤدي إلى تفاعلات دوائية خطيرة وتأثيرات جانبية "خارج الهدف" في بعض الحالات (Nguyen *et al.* , 2020 ; Thompson *et al.* , 2019 ; Thompson *et al.* , 2017 ; Qu *et al.* , 2013) .



الشكل (1-1) آلية عمل المضادات الفطرية (Salazar *et al.*, 2020)

2.6.1. البولينات Polyenes

المضادات الحيوية من البولينات ، التي تنتجها أنواع *Streptomyces* ، لها طيف أوسع من العديد من الأدوية الأخرى المضادة للفطريات ، وهي بطبيعتها قاتلة للفطريات وليست مثبطة لنمو الفطريات كما في الازولات (Brajtburg *et al.* , 1990 ; Moen *et al.* , 2009) .

يحقق البولين هذه الفعالية القاتلة للفطريات عن طريق ربط الارغوستيرول الموجود في غشاء الخلية الفطرية ؛ مما يؤدي إلى زيادة النفاذية و تسرب مكونات الخلية الداخلية ؛ و بالتالي موت الخلية كما في الشكل(1-1) (Van Daele *et al* . , 2019 ; McCarthy *et al.* , 2017) .

Amphotericin B .1.2.6.1

هو احد مضادات مجموعة البوليين التي لها نشاط مضاد للفطريات واسع النطاق ضد معظم أنواع الخمائر والاعفان و انواع الليشمانيا البدائية (protozoan *Leishmania spp.*) (Moen *et al.*, 2009 ; Stone *et al.* , 2016) .

يتم إنتاجه بشكل طبيعي من قبل البكتريا الشعاعية (Actinomyces) في التربة ، *Streptomyces nodosus* (2013 , Hamill) . اكتشفت الدراسات السابقة فطر آخر يقوم بتخليق AmB مؤخرًا وهو *Penicillium nalgiovense* (Svahn *et al.* , 2015) .

الصفات الرئيسية لـ AmB هي لونه الاصفر و قابليته المنخفضة الذوبان في الماء ومعظم المذيبات العضوية ولكن يمكن أن تزيد قابلية الذوبان عند درجة حموضة أقل من 2 أو أكثر من 11 (Torrado *et al.*, 2008) . على مدار أكثر من 50 عامًا ، لا يزال AmB يفضل استخدامه بكفاءة عالية في الطب السريري لعلاج الاصابة الفطرية المختلفة في جسم الإنسان (Baginski and Czub , 2009 ; Volmer *et al.* , 2010) .

تعد المقاومة الفطرية المنخفضة والفعالية المضادة للفطريات واسعة الطيف من أهم الخصائص الصيدلانية التي تشجع على الاستخدام المستمر لـ AmB (Lanternier and Lortholary , 2008) . على الرغم من الاستخدام السريري الواسع لـ AmB لأكثر من خمسة عقود ، نادرًا ما يتم تسجيل المقاومة الفطرية حتى الآن مقارنة بالعوامل المضادة للفطريات الأخرى (Ghannoum and Rice , 1999 ; Cannon *et al.* , 2007 ; Mesa - Arango *et al.* , 2012 ; Gray *et al.*, 2012) .

كما هو الحال مع أي دواء ، فإن AmB له آثار جانبية قد تمنع استخدامه حتى في وجود اصابة فطرية جهازية خطيرة . السمية الكلوية هي الآثار الجانبية الرئيسية الناتجة عن الاستخدام المزمن لأكثر من 35 ملغم / يوم من AmB (Laniado - Laborín and Cabrales - Vargas , 2009) .

كما أنه يؤثر على قدرة الكبد على التمثيل الغذائي عن طريق التداخل مع السايتوكروم الكبدي P450 (Inselmann *et al.*, 2002) . ومع ذلك ، فإن التركيبة القديمة لـ AmB التي تحتوي على deoxycholate لها تأثيرات سمية كلوية أكثر من التركيبة الدهنية الجديدة التي تم تطويرها في عام 1990 والتي تطلق تركيز AmB منخفض حر في المصل (Torrado *et al.*, 2008) . AmB مضاد فطري قوي و قاتل ضد أجناس المبيضات (Kumar *et al.* , 2018) .

في مصل الدم ، حُدد التركيز الأدنى والتركيز الاعلى لمستويات AmB لاكتساب فعالية كافية وللحد من التأثيرات السامة . يتراوح التركيز المثبط الادنى (MICs) من AmB بين 0.125 - 1.0 ملغم / لتر (Rex *et al.* , 1995 ; Lee *et al.* , 2002) وعادة ما تكون أقل من 0.38 ملغم / لتر (Hajjeh *et al.*, 2004) .

2.2.6.1. آلية العمل Mechanism of action of AmB

هنالك الكثير من الفرضيات التي تفسر آلية التأثير التي يعمل بها مضاد AmB واحدى هذه الفرضيات تفسر تأثيره بارتباط AmB بالارغوستيرول ، وهو المكون الرئيسي للغشاء البلازمي للفطريات (Hartsel *et al.*, 1993 ; Shimizu *et al.*, 2010 ; Mesa - Arango *et al.*, 2012 ; Gray *et al.*, 2012 ; Stone *et al.*, 2016) .

عند توافر AmB بتراكيز عالية يؤدي الى تسرب لأيونات البوتاسيوم والمغنيسيوم (+K و +Mg) داخل الخلايا الفطرية مما يزيد من حموضة هذه الخلايا ، وبالتالي موت الخلايا . وهنالك فرضية اخرى تفسر تأثير AmB المضاد للفطريات عن طريق تفاعله مع الارغوستيرول الغشاء البلازمي مما يعمل لتشكيل قنوات عبر الغشاء وهناك تلعب تفاعلات جزيئات الهيدروجين الموجودة داخل الخلية مع الهيدروكسيل و الكاربوكسيل والمجاميع الامينية دورا في استقرار تلك القنوات وابقائها مفتوحة والسماح للبلازما الخلوية بالتسرب الى الخارج . بالإضافة الى ما سبق من الفرضيات هنالك فرضية تفسر الفاعلية التضادية في AmB لأنها ناتجة عن زيادة في الجهد المؤكسد وذلك بتكوين الجذور الحرة داخل الخلية (Hamill , 2013) .

AmB لديه القدرة على تحفيز الاستجابة المناعية ضد الالتهابات بسبب خصائصه المعدلة للمناعة ؛ وهذا سيعطي الفرد المصاب وخاصة أولئك الذين يعانون من ضعف المناعة ، عملية وقائية أخرى ضد الاصابة الفطرية (Mesa - Arango *et al.*, 2012) .

3.6.1. الاشنوكاندين Echinocandins

هي فئة مهمة سريريًا من الببتيدات الدهنية المضادة للفطريات غير الرايبوسومية (Non-ribosomal antifungal lipopeptides) التي تنتجها الفطريات الخيطية (Ascomycota) . يعد التخليق الحيوي للإشنوكاندين واسع الانتشار وإن لم يكن شائعًا بين الفطريات الكيسية (Ascomycetes) (Yue *et al.* , 2015) .

الإشنوكاندين هي مضادات فطرية قوية وسريعة ضد *Candida* spp. ويشمل طيفها التثبيطي الواسع ايضا *Aspergillus* spp. و *Pneumocystis carinii*، نظرًا لتأثيرها التثبيطي القوي على انزيم 1,3-β- D-glucan synthase وهو انزيم مطلوب للتخليق الحيوي لجدار الخلية الفطرية (Denning, 2002) كما في الشكل (2-1) .

4.6.1. نظير البريميدين Pyrimidine analogue

يتفاعل نضير البيريميدين على مستوى نواة الخلية الفطرية ، فهو يؤثر على التخليق الحيوي للبروتين والحامض النووي الرايبوسومي منقوص الأوكسجين (DNA) كما في الشكل (2-1) (Carmona and Limper , 2017) .5 - فلوسايتوسين (5-Flucytosine) ، هو جزيء صغير محب للماء ، يتم امتصاصه بسرعة ، وتوافره الحيوي يصل إلى 90٪ تقريبًا . تأيض إنزيمات الكبد (5-FC) إلى الحد الأدنى (Momparler , 2013) .

تشمل الآثار الجانبية الشديدة تسمم الكبد ، والسمية النخاعية ، ومشاكل في الجهاز الهضمي (Vermes *et al.* , 2000) .

جدول (1- 1) الأدوية الرئيسية المضادة للفطريات وأهدافها في الخلية (Martinez - Rossi *et al.* , 2008) .

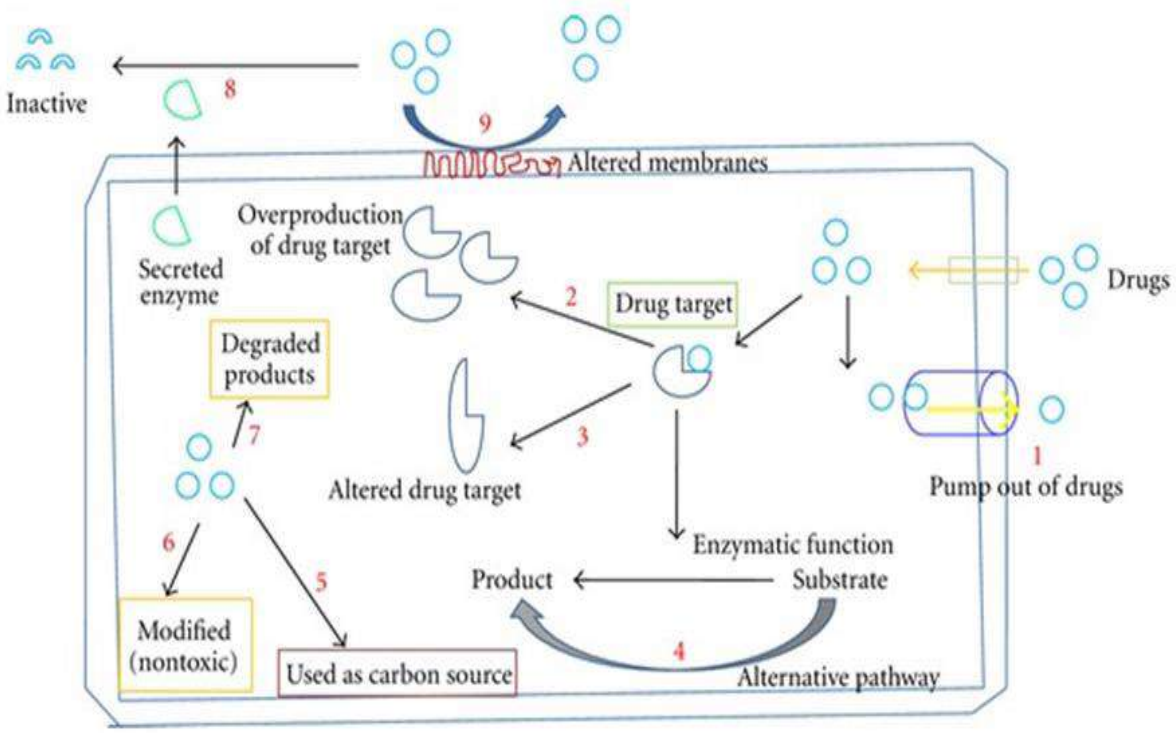
Chemical classes	Drug	Target
Azoles	Miconazole Ketoconazole Fluconazole Itraconazole Terconazole Voriconazole Posaconazole	Ergosterol synthesis يستهدف تصنيع الارغوسيترول
Polyenes	Amphotericin B Nistatin	Ergosterol (membrane function) ايضا يستهدف الارغوسيترول
Pyrimidine	Flucytosine	DNA and RNA synthesis يستهدف تصنيع شريط DNA و RNA
Echinocandins	Caspofungin Micafungin Anidulafungin	Glucan synthesis يستهدف تصنيع الكلوكان

7.1.مقاومة العقاقير Drug Resistance

صُنفت آليات مقاومة المضادات الفطرية على أنها إما أولية أو ثانوية وترتبط بالخصائص الذاتية أو المكتسبة لمسببات الأمراض الفطرية ، والتي تتضمن إما التداخل مع الية المضاد الفطري للدواء الخاص به أو انخفاض في مستويات الأدوية الهدف. يمكن أن تحدث المقاومة أيضًا عندما تؤدي العوامل البيئية إلى استعمار أو استبدال الأنواع الحساسة بأنواع مقاومة . ترجع تأثيرات المضادات الفطرية لمضادات البوليين والآزول إلى تأثيرها على غشاء الخلية الفطرية ، في حين تعمل االاشينوكاندين عن طريق تعطيل جدار الخلية الفطرية (Pfaller, 2012 ; Pemán *et al.* , 2009 ; White *et al.*, 1998) .

تعد قدرة المبيضات لتكوين الأغشية الحيوية المقاومة للأدوية هو عامل مهم في مساهمته في الأمراض التي تصيب البشر مثل الغالبية العظمى من الأغشية الحيوية الميكروبية (Rajendran *et al.*, 2010). على الرغم من أن الاصابات التي تسببها أنواع المبيضات يتم علاجها بالعقاقير المضادة للفطريات المتاحة على النحو المذكور أعلاه ، إلا أن مقاومة الأدوية تشكل مشكلة خطيرة على صحة المرضى وتصبح إدارة نظام الرعاية الصحية أمرًا صعبًا . أظهرت الدراسات أن العديد من العوامل بما في ذلك ضخ الأدوية الى الخارج من قبل الخلايا الفطرية (Efflux pump) ، وتحوير الخلايا المستهدفة عن طريق دمج الطفرات النقطية في الجينات ، وتحوير الإنزيمات الرئيسية لمسارات التخليق الحيوي ، وتعديل عوامل النسخ تلعب أدوارًا مهمة في هذه الظاهرة (الشكل1-2) (Morschhäuser, 2010; Cannon *et al*.,2009).

ان الإفراط في استخدام العوامل المضادة للفطريات يزيد من مقاومة العوامل الممرضة الانتهازية (Revie *et al*.,2018).



الشكل(1-2) الآليات المحتملة لمقاومة الأدوية في أنواع المبيضات (Kabir and Ahmad , 2013) .

الاليات المحتملة لمقاومة الأدوية في أنواع المبيضات هي :.

(1) يتم ضخ الأدوية إلى الخارج بوساطة مضخة التدفق(Efflux pump).

(2) الأهداف الدوائية مثل : الإنزيمات يتم إنتاجها بشكل مفرط ولا يمكن للأدوية أن تثبط التفاعلات الأنزيمية .

(3) بسبب الطفرات ، يتم تغيير هياكل الإنزيمات أو البروتينات الأخرى ولا يمكن للأدوية الارتباط بها.

(4) يمكن تحويل مسار الوظيفة الأنزيمية التي يثبطها الدواء.

(5) يمكن أن تتحلل الأدوية وتستخدم كمصدر للكربون.

(6) يمكن تعديل الأدوية عن طريق الإنزيمات وتصبح غير سامة.

(7) تتحطم الأدوية وتصبح غير فعالة وظيفيا.

(8) قد يؤدي إنزيم خارج الخلية إلى تحلل الأدوية خارج الخلية الفطرية وجعلها غير فعالة.

(9) قد يثبط الغشاء المتغير دخول الأدوية إلى الخلية ولا يمكن للأدوية أن تعمل.

8.1.المستخلصات النباتية واستخداماتها ضد الفطريات Plant Extracts and uses against fungi

تُعد النباتات مصدرًا طبيعيًا للعديد من المركبات النشطة حيويًا ، والتي توفر فوائد صحية مرغوبة بعد المغذيات الأساسية (Cartea *et al.*,2011) . وكذلك تعد النباتات الطبية مصدرًا جيدًا لإعداد المستحضرات الصيدلانية الحديثة والعوامل العلاجية الجديدة كأدوية بديلة عن أنظمة الأدوية التقليدية (Paul *et al.*, 2015 ; Sangeetha and Vijayalakshmi , 2012) .

نظرًا لتأثيراتها الطفيفة وانخفاض تكلفتها ، تُستخدم المنتجات الطبية الطبيعية كثيرًا في البلدان النامية مثل : السودان لعلاج العديد من الأمراض البشرية المختلفة (Karar and Kuhnert , 2017) . تعزى الأنشطة الدوائية للنباتات إلى وجود مادة متعدد الفينول (polyphenols) (Ali *et al.*, 2014) .

تعرف المركبات الفينولية على أنها مواد ايضية ثانوية غير مغذية ولا تشارك في نمو النبات و تكاثره (Al- Rawahi *et al.*, 2014) . تشمل المركبات الفينولية من الأعشاب الطبية الأحماض الفينولية (Phenolic acids) و الفلافونويد (Flavonoids) والتانينات (Tannins) . تعد الفعاليات الحيوية المختلفة للمركبات الفينولية مسؤولة عن خصائصها العلاجية (على سبيل المثال ، مضادات الأكسدة و مضادات السرطان ، و مضادات الطفرات ، و مضادات الميكروبات ، و مضادات الفطريات ومضادات الالتهابات) (Barros *et al.* , 2014 ; Sh *et al.* , 2017).

تنتج العديد من النباتات مواد طبيعية يتم تصنيعها لأداء وظيفة حيوية متعددة الاستخدامات للنبات ، ويمكن أن تكون هذه المواد مفيدة جدًا في الطب ، وخاصة منتجات النباتات الطبية (Magbool *et al.*, 2018). يمكن استخدام الأدوية العشبية في صياغة عقاقير جديدة مضادة للميكروبات للتغلب على مشكلة مقاومة المضادات الحيوية الصناعية المتوفرة (Yehia *et al.*, 2011).

1.8.1. نبات البلوط The oak plant

ينتمي جنس البلوط *Quercus pagoda* إلى عائلة Fagacae ، فصيلة Quercoideae ، ويحتوي على حوالي 400 نوع منتشر في أوروبا ، وآسيا وأمريكا . منذ العصور الوسطى ، استخدم لحاء هذه الأشجار في الطب التقليدي وتطبيقه موضعيًا على الحروق والجروح أو عن طريق الفم لعلاج أمراض الجهاز الهضمي ومن بين النباتات التي تم استخدامها بلوط الكرز (Popović *et al*,. 2013).

الأساس المنطقي المعروف للاستخدام العلاجي لقشرة البلوط هي الفعالية المباشرة المضادة للبكتيريا ضد العديد من البكتيريا المرضية للإنسان والحيوان . عادةً ما يوصف لحاء البلوط بأنه مصدر للمنتجات الايضية الثانوية متعددة الفينول (Polyphenolic secondary metabolites) : التانينات القابلة للتحلل بالماء (Hydrolysable tannins) ، والتي كانت تُعرف سابقًا باسم تانينات البيروكالول (Pyrogallol -tannins) ، والتانينات المكثفة - البروانثوسيانيدين (Tannins- condensed proanthocyanidins) (Haslam *et al.*, 2007) .

يتراوح المحتوى الإجمالي للتانينات في المادة المجففة من 3-20 % ، اعتمادًا على وقت الحصاد وعمر الفروع وطريقة الفحص المستخدمة . ويعزى تأثيرها المضاد للميكروبات للتانينات (Ebrahimi , 2012). لا تزال آليات فعالية المضادات الحيوية للعديد من النباتات غير معروفة ، ولكن معظم فعالية مضادات الميكروبات يُعزى إلى المركبات الكيميائية الفعالة ، والتي تُعرف باسم المواد الايضية الثانوية الموجودة في النبات . يحتوي مستخلص البلوط خاصة مستخلص اللحاء على مركبات مهمة مضادة للميكروبات مثل : حامض الغاليك (Gallig acid) ، أو حامض الإيلاجيك (Ellagic acid) ، أو الفيسكالاجين (Vescalagin) أو الكاستالاجين (Castalagin) (Sorrentino, *et al.* , 2018) .

يمكن أن تكون الفعالية المضادة للبكتيريا والفطريات نتيجة لنوع الاستخلاص ، ووقت الحصاد ، وأنواع أشجار البلوط ، وجودة الأداة و طرق القياس (Tayel *et al*,.2013) .

وكذلك تستخدم مستخلصات البلوط في صناعات مستحضرات التجميل والأدوية (Sati *et al.* , 2012) . و في الصناعات الغذائية يمكن استخدام مستخلص البلوط كمطهر طبيعي أو لمساعدة المزارعين على تجنب مبيدات الفطريات بسبب مخاطرها البشرية والبيئية (Dania *et al.* , 2014) .

2.8.1. نبات الرمان The pomegranate plant

يُطلق على *Punica granatum* L. اسم الرمان وينتمي إلى عائلة Punicaceae ، وهو ثمرة مهمة في المناطق الاستوائية و شبه الاستوائية (Farag *et al.*, 2014) . تعد فاكهة الرمان واحدة من أقدم الفواكه الصالحة للأكل ، والتي حظيت باهتمام كبير بسبب فوائدها الطبية المتزايدة في السنوات الماضية (Hmid *et al.*, 2017) . جميع أجزاء فاكهة الرمان هي مصادر جيدة للمركبات الفعالة حيويًا وقد استُخدمت في الطب الشعبي لعلاج مجموعة متنوعة من الأمراض (Wu and Tian , 2017) .

قشور الرمان هي الجزء الأكثر وفرة بالمركبات الفعالة حيويا في الفاكهة و لها فعالية حيوية أقوى من العصارة (Alexandre *et al.*, 2019). قشور ثمار الرمان جزء غير صالح للأكل وهي منتج ثانوي لمعاملة العصارة (Rowayshed *et al.*, 2013) .

قشور الرمان معروفة بشكل واسع في الطب الشعبي في جميع أنحاء العالم بسبب قابليته القوية على القبض (Panichayupakarananta *et al.* , 2010 ; Kaneria *et al.* , 2012) .تشمل الخصائص العلاجية لقشور الرمان التئام الجروح ، وعلاج الإسهال ، وكعامل مضاد للملاريا والطفيليات ، ومنشط الدم ، وعلاج لمرض السكري ، والحماية من امراض القلب و الأسنان ، وعلاج العقم عند الرجال ، ومضاد لارتفاع ضغط الدم (Al-Rawahi *et al.* , 2014 ; Middha *et al.* , 2013 ; Alexandre *et al.* , 2019) . أفادت الدراسات أن مستخلصات قشور الرمان لها فعالية مضادة ضد بعض مسببات الأمراض البشرية ؛ لذا يمكن استخدامها كبديل للمضادات الحيوية في العلاجات الميكروبية (Ferrazzano *et al.* , 2017) .

3.8.1. نبات الشاي الاخضر Green tea plant

يعد الشاي (*Camellia sinensis*) أكثر المشروبات شعبية في جميع أنحاء العالم ، وقد حظي مؤخرًا باهتمام الأوساط الصيدلانية والعلمية بسبب كثرة المركبات العلاجية الطبيعية المرتبطة به (Siddiqui *et al.* , 2016 ; Wang *et al.* , 2017) .

الشاي بشكل عام غير ضار وغير سام وقد ثبت أن له تأثيرات فسيولوجية وفعالية مضادة للأكسدة ومضادة للالتهابات (Prabhakar *et al.* , 2010) . اعتمادًا على عملية التصنيع ، يتم تصنيف أنواع الشاي إلى 3 انواع رئيسية : الشاي غير المخمر (الشاي الأخضر والأبيض green and white tea) ، وشبه المخمر (الشاي الصيني الاسود oolong tea) ، والمخمّر (الشاي الأسود و الأحمر black and red tea) ، على الرغم من أن جميع أنواع الشاي تأتي من نفس النبات (Siddiqui *et al.* , 2016) .

تمت دراسة الفعالية المضادة للميكروبات لمتعدد الفينول (Polyphenole) الموجود في الشاي في العديد من الدراسات السابقة ، على الرغم من أن دراسات قليلة فقط قد بحثت في الفعالية المضادة للفطريات لهذه المركبات (Friedman , 2007 ; Mathur *et al.* , 2018) .

ان مضادات الاكسدة الرئيسية للشاي : (Epigallocatechin EGC) ، و (Epicatechin EC) ، و (Epigallocatechin gallate EGCG) ، و (Epicatechin gallate ECG) ، وهي تمثل ما يصل إلى 30٪ من الوزن الجاف لأوراق الشاي الطازجة (Siddiqui *et al.* , 2016) .

قد تكون الفعالية المضادة للفطريات لمستخلصات الشاي مرتبطة بمضادات الاكسدة ، مثل : (EGCG) (Hirasawa and Takada , 2004) . وقد تمنع هذه المركبات تخليق الإرغوستيرول عن طريق منع ايض حامض الفوليك في *C. albicans* (Ning *et al.* , 2015) .

الفصل الثاني

المواد وطرائق العمل

Materials & Methods

2. المواد وطرائق العمل Materials and methods

1.2. الأجهزة و المواد المستخدمة

1.1.2. الأجهزة المستخدمة والشركات المصنعة لها:

أُستخدمت الاجهزة والادوات التالية في الجدول(2-1) في اجراءات الدراسة .

جدول(2-1) الاجهزة والأدوات المستخدمة في هذه الدراسة

ت	اسم الجهاز	الشركة المصنعة \المنشأ
1	حاضنة هزازة Shaker incubator	Labtech – korea
2	ميزان حساس Sensitive Balance	Denver – Germany
3	مقياس الكثافة Dens chake plus	Biomeriux – USA
4	الفرن الكهربائي Oven	Memmert - Germany
5	ماصات دقيقة Micropipettes	Human – Germany
6	هود بايلوجي Laminar flow cabinet	Thermo-sientific -Gemany
7	مصباح بنزن Bunsen burner	Jenway – Germany
8	جهاز مزج ذو الصفيحة الساخنة Magnetic Stirrer with hot plate	J.P.SELECTA,s.a - Spain
9	مؤصدة Autoclave	J.P.SELECTA,s.a - Spain
10	ثلاجة Refrigerator	House dream - china

11	المجهر الضوئي	Light microscope	Motic – Germany
12	الحاضنة	Incubator	Binder – Germany
13	المازج	Vortex	ROMA – Italy
14	جهاز الفايتك	Vetik-2 Compact System	Biomeriux - USA
15	جهاز الطرد المركزي	Centrifuge	Hettich – Germany
16	حمام مائي	water bath	Tafesa - Germany
17	المطحنة الكهربائية	Electric Grinder	Denka - Korea
18	جهاز التقطير	Distiller	GFL – Germany

2.1.2. الأوساط الزرعية والشركات المصنعة لها

أُستخدمت الاوساط الزرعية التالية في الجدول (2-2) ، حضرت الاوساط حسب توصيات الشركات المصنعة لها وعقمت بواسطة جهاز المؤصدة .

جدول(2-2) الاوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة الحالية

ت	اسم المادة		المنشأ الشركة المصنعة
1	وسط السابرويد دكستروز اكار	Sabouraud dextrose agar	Mast group - U.K
2	وسط	Brain - Heart infusion broth	Himedia – India

3.1.2. المواد الكيميائية والشركات المصنعة لها

أُستخدمت المواد الكيميائية التالية في الجدول (2-3) .

جدول(2-3) المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة

ت	المواد	الشركة المصنعة
1	كليسرول	BDH – England
2	كحول الايثانول المطلق 96 %	Scharlau - European Union
3	محلول التخفيف (كلوريد الصوديوم 0.45%)	CareFusion – Mexico
4	مذيب Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Loba chemie – india
5	محلول التخفيف (كلوريد الصوديوم 0.9 %)	LINCOLN – India
7	المضاد الفطري الامفوترسين بي Antifungal AmB	BANGALORE PHARMAceUTICUL & RESEARCH LABORATORY PVT.LTD

4.1.2. العدد Kits

استخدمت العدد التالية لغرض التشخيص وفحص الحساسية بجهاز الفايتك في الجدول (2- 4)

جدول(2-4) العدد المستخدمة للتشخيص وفحص الحساسية

ت	اسم عدة التشخيص	غرض الاستعمال	الشركة المصنعة
1	VITEK-2 yst card	لتشخيص الخمائر	BioMerieux
2	VITEK-2 AST card	لاختبار الحساسية للمضادات الحيوية	BioMerieux

2.2. طرائق العمل

جمعت 75 عينة (50 عينة للمهبل و 25 عينة للإدرار) من المريضات اللاتي يعانين من الالتهابات في الجهاز البولي التناسلي من مستشفى الكفيل التخصصي و العيادات الطبية الخاصة في محافظة كربلاء المقدسة والمشخصة سريريا من قبل الاطباء المختصين على انها اصابة بالمبيضات ؛ اذ تم الفحص المباشر لعينات الادرار وزرعها على الوسط الزرعي اما عينات المهبل فقد تم زرعها مباشرة . المختبر الذي تم العمل فيه هو مختبر العام في مستشفى الكفيل التخصصي في كربلاء.

اخذت العينات المهبلية عن طريق الطبيب بوساطة المسحات القطنية المعقمة التي تحتوي على الوسط الناقل . وبعدها نقلت العينات الى المختبر وزرعت على وسط SDA وحضنت بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24-48 ساعة ثم تنقيتها للحصول على مستعمرات نقية (اخذ مستعمرتان من الطبق الزرعي وزرعت بواسطة لوب بلاستيكي على الوسط الزرعي من جديد) وبعدها اجري التشخيص بوساطة جهاز الفايتك.

1.2.2. وسط سابرويد دكستروز اكار Sabouraud's Dextrose Agar

حُضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة ، وذلك بإذابة 62 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر .عُقم الوسط باستخدام المؤصدة Auto clave بدرجة حرارة 121 مْ وضغط 15 باوند \ انج ، وبعد اكمال عملية التعقيم بُرد إلى درجة (45) مº ، وتم صبه في أطباق بتري معقمة. استخدمت الاطباق لتنمية العزلات الفطرية لغرض التشخيص (Raju & Rajappa, 2011) .

2.2.2. وسط Brain – Heart infusion broth

حُضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة ، وذلك بإذابة 37 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر ، وزرع في أنابيب مختبرية (Test tube) وبعدها عقم بالمؤصدة ؛ و أستخدم هذا الوسط لغرض قياس فعالية المضاد الفطري الامفوترسين بي ، و حفظ العزلات الفطرية على المدى الطويل ، وذلك بإضافة 15 % كليسيرول الى 85 % من الوسط بعد تعقيمه .

3.2.2 تشخيص العزلات الفطرية

شُخصت العزلات الفطرية عن العزلات البكتيرية بصورة اولية اعتمادا على الشكل الخارجي للنمو الفطري والفحص المجهري من قبل الدكتور زهير حميد عبود الظويهري الاختصاص – فطريات طبية - كلية العلوم – جامعة كربلاء . وبعدها تم التشخيص بوساطة جهاز الفايتك (Hata *et al*.,2007) . يُعد نظـام الفايتك من الأنظمة التشخيصية الحديثة والسريعة في التشخيص البكتيري والخميري , إذ يعطي نتائج دقيقة تصل دقتها إلى 99%. ولغرض التأكد من العزلات الخميرية أستخدم النظام أعلاه وحسب تعليمات الشركة المجهزة لهُ ، إذ يتكون من مكونين اساسيين ,هما : الآلة Instrument وجهاز الكمبيوتر , والآلة تتكون من خمسة مكونات اساسية هي :

1- لوحة التحكم (keypad)
2- باب المليء (Fill Door) ويتم فيه انتقال العينة من انابيب الاختبار الى داخل البطاقة (Kit) بوساطة انبوب ناقل موجود في البطاقة وتستمر هذه العملية 70 ثانية .
3- باب التحميل (Load Door) ويتم فيه قطع الانبوب الناقل الموجود على البطاقة ونقل البطاقة الى داخل الحاضنة وتستمرهذه العملية 3-5 دقيقة .
4- باب وصول المستخدم (User access Door) ويتم فيه الحضن وقياس التغيرات التي تطرأ على البطاقة نتيجة لنمو الخمائر لإعطاء النتيجة .
5- باب النفايات (Waste Door) ويتم فيه تجميع البطاقات بعد الانتهاء من التحاليل وإعطاء النتيجة .

استعمل هذا الجهاز في تأكيد تشخيص العزلات واختبار الحساسية للمضادات الحيوية ؛ ويتم التشخيص من خلال عدد ملحقة بالجهاز ، إحداهما خاصة بالتشخيص (هي yst card) ، والاخرى خاصة بفحص الحساسية (هي AST-P580 card) , تحتوي عدة التشخيص على 64 حفرة يوجد فيها وسط مجفف ودليل لوني تجري فيه الاختبارات الكيموحيوية ويسجل الجهاز التغيرات اللونية الحاصلة نتيجة لنمو الخمائر في جدول , بينما تحتوي عدة اختبار الحساسية للمضادات الحيوية على 18-20 مضادا حيويا موزعا على 64 حفرة ويكون لكل مضاد أكثر من تركيز ويسجل الجهاز التغيرات الحاصلة في العكورة بعد نمو الخمائر .

أجريت الاختبارات على النحو الاتي :

1- تحضير المزرعة الفطرية : زرعت العزلات (41 عزلة) على وسط السابرويد دكستروز اكار الصلب بطريقة التخطيط , وحضنت بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة ، بعدها أخذت أنبوبة اختبار بلاستيكية شفافة ووضع فيها 3 مل من المحلول الفسلجي الملحي (Normal saline) ، وملئت الأنابيب بوساطة Dispensette ، ثم اخذت مستعمرتان منفردة بوساطة لوب بلاستيكي معقم ووضعت في الأنابيب لعمل عالق (Suspension) ، ثم قيست الكثافة بوساطة جهاز (Densichek ^{TM} plus) بعكورة تعادل 2.0 McFarland القياسي . وبعدها نقلت البطاقة المتصلة بوحدة أنبوب النقل وثُبتت على حامل خاص لغرض إدخالها داخل الجهاز.

2- نقلت البطاقات يدويا إلى باب التحميل ثم يقوم الجهاز بقطع أنبوب النقل , بعد ذلك ملئت البطاقات ، واحتضانها وقراءتها تلقائيًا بواسطة VITEK 2 وتراوح وقت الحضانة بناءً على معدل النمو من 10 إلى 30 ساعة . ويتم قياس النتائج بالتركيز المثبط الادنى (MICs) بالميكروغرام لكل مليلتر ، تم هذا العمل في مختبر العام في مستشفى الكفيل التخصصي .

4.2.2.المضادات الفطرية :-

المضادات الفطرية المستعملة و المجهزة من شركة BioMerieux الفرنسية ؛ في الجدول (2-5)

جدول 2-5 المضادات الفطرية المستخدمة في فحص الحساسية

ت	المضادات الفطرية	رمز المضاد
1	Fluconazole	FLZ
2	Voriconazol	VCZ
3	Caspofugin	CASP
4	Micafugin	MCF
5	Amphotericin B	AmB
6	Flucytosine	5-FC

3.2. النباتات المستخدمة في الدراسة

اولاً:- تشخيص العينات النباتية

شخصت العينات النباتية من قبل الدكتور ابراهيم صالح الجبوري – نباتات طبية كلية الصيدلة - جامعه كربلاء .كما موضح في الجدول(2-6) .

جدول (2-6) النباتات المستخدمة في الدراسة

ت	اسم النبات المحلي	الاسم العلمي	العائلة النباتية	الجزء المستخدم
1	البلوط	*Quercus pagoda*	Fagaceae	لحاء الساق
2	الشاي الاخضر	*Camellia sinensis*	Theaceae	الاوراق
3	الرمان	*Punica granatum*	Punicaceae	قشور الثمرة

ثانياً :- جمع و تهيئة النباتات المستخدمة في الدراسة

جمعت النباتات المستخدمة في الدراسة الحالية وذلك بشرائها من الأسواق المحلية ، بعدما أُزيلت الشوائب ، والأتربة ، وغسلت بالماء المقطر و تركها لتجف بدرجة حرارة الغرفة ، ثم طُحنت الأجزاء النباتية كلا على حدة بالمطحنة الكهربائية ، ثم حفظت في علب زجاجية جافة و نظيفة لحين استخدامها وخزنت في المختبر (الغزالي ، 2012) .

4.2. اختبار فاعلية النباتات المدروسة

أجري اختبار فاعلية النباتات على ثلاث مراحل أذ تم في المرحلة الاولى تحضير المستخلصات واختبار تأثيرها على نمو خمائر المبيضات المشمولة بالدراسة ، وفي المرحلة الثانية خُلط مستخلصان نباتيان ، وفي المرحلة الثالثة خُلط المستخلص مع المضاد الفطري (الغزالي ، 2012) .

1.4.2. مستخلصات النباتات الكحولية :

مُزج 20 غم من مسحوق نباتات البلوط ، والرمان والشاي الاخضر كلاً على حدة مع 200 مل كحول الايثانول 96% بدورق حجمي بسعة لتر ، ثم وضع العالق في الحاضنة الهزازة لمدة 48 ساعة . رشح العالق بوساطة عدة طبقات من الشاش الطبي ، ثم عقم الراشح خلال اوراق الترشيح وجمع الراشح المعقم في قنينة زجاجية معقمة ، ووضع في طبق زجاجي مفلطح في الفرن الكهربائي بدرجة حرارة 40 مْ لمدة 48 ساعة ، و أُزيل المذيب عن طريق التبخر حتى اصبح المترسب من الراشح بشكل مسحوق ملتصق على الزجاج ، ثم قشط وجمع في حاوية زجاجية محكمة الاغلاق ، و حفظ المستخلص بعد وزنه في الثلاجة لحين الاستعمال. وكررت العملية مرات عديدة للحصول على كمية كافية من المستخلص (الغزالي ، 2012) .

2.4.2.التراكيز المستخدمة في التجربة

حُضر محلول خزين Stock Solution لكل مستخلص من المستخلصات النباتية ، وذلك بإذابة 1 غم من مسحوق النبات في 10 مل من الماء المقطر المعقم . ومنه حضرت التراكيز المطلوبة في التجربة (25 , 50 , 75 , 100) ملغم / مل (Mitscher *et al.*,1972).

3.4.2.اختبار الفاعلية التثبيطية للمستخلصات النباتية على نمو المبيضات المدروسة

حضر وسط SDA وتم صبه في الاطباق وتركت لحين التصلب ثم اتبعت طريقة الانتشار في الاكار (Agar ditfusion methad) بواسطة الحفر (Egorove , 1985) في اختبار حساسية الخمائر للمستخلصات النباتية الشاي الاخضر، و قشور الرمان والبلوط . تتضمن طريقة نشر 0.1 مل من العالق الخميري على الوسط و عمل اربع حفر بأبعاد متساوية في وسط SDA وبقطر(5 ملم) بوساطة الثاقب الفليني Cork Borrer ، واضيفت تراكيز المستخلص بمقدار 0.2 ملغم /مل لكل حفرة بعد وبتراكيز مختلفة من المستخلص النباتي . تركت الاطباق في الحاضنة لمدة 24 ساعة لانتشار مستخلصات النباتات في الوسط الزرعي تم قياس قطر منطقة التثبيط بوساطة المسطرة (Saxena *et al.*, 1996) .

4.4.2. الفاعلية التآزرية للمستخلصين

مُزج مستخلص قشور الرمان بتركيز 25 ملغم / مل مع مستخلص البلوط (الجفت) بتركيز 25 ملغم / مل وهكذا لبقية التراكيز لمعرفه الفعالية التازرية بين المستخلصين معا وكما في الجدول (2- 7) .

جدول (2-7) مزج التراكيز المختلفة من مستخلص قشور الرمان مع مستخلص البلوط

ت	تركيز مستخلص قشور الرمان	تركيز مستخلص البلوط	تركيز المستخلصين معا
1	25 ملغم / مل	25 ملغم / مل	25 ملغم / مل
2	50 ملغم / مل	50 ملغم / مل	50 ملغم / مل
3	75 ملغم / مل	75 ملغم / مل	75 ملغم / مل
4	100 ملغم / مل	100 ملغم / مل	100 ملغم / مل

1.5.2. تحضير المضاد الفطري AmB

أُذيب (50 mg) من المضاد الفطري AmB مع 2.5 مل من الماء و2.5 مل من مذيب DMSO اخذ 1 مل (10 ملغم/مل) من المضاد ثم حفظ المتبقي (4 مل) في الثلاجة . اضيف 1 مل من المضاد الى 1 مل من وسط Brain - Heart infusion broth لعمل سلسلة تخافيف (25 تخفيف) كما في الجدول (2 – 8) لمعرفه التركيز المثبط الادنى للخميرة ، ثم لُقحت الانابيب ب (10 مايكروليتر) من *C.albicans* ، ثم حضنت الانابيب بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة . زرعت الانابيب جميعها للتأكد من النمو ، وبعد الحضن كان النمو في الطبق الذي يعود للأنبوبة 24 ، والتي كانت بتركيز 0.001 مايكرو غرام / مل من المضاد الفطري (ويعد هذه التركيز اقل من التركيز المثبط الادني MIC). (Ito *et al.* , 2004)

جدول (2-8) عدد الانابيب وتركيز المضاد في كل انبوبة والنمو فيها

تسلسل الانابيب المختبرية	تركيز المضاد في الانبوبة مايكروغرام / مل	النمو في الانابيب
الانبوبة 1	10000	_
الانبوبة 2	5000	_
الانبوبة 3	2500	_
الانبوبة 4	1250	_
الانبوبة 5	625	_
الانبوبة 6	312.5	_
الانبوبة 7	156.2	_
الانبوبة 8	78.1	_
الانبوبة 9	39	_
الانبوبة 10	19.5	_
الانبوبة 11	9.7	_
الانبوبة 12	4.8	_
الانبوبة 13	2.4	_

الانبوبة 14	1.2	_
الانبوبة 15	0.6	_
الانبوبة 16	0.8	_
الانبوبة 17	0.15	_
الانبوبة 18	0.07	_
الانبوبة 19	0.03	_
الانبوبة 20	0.01	_
الانبوبة 21	0.009	_
الانبوبة 22	0.004	_
الانبوبة 23	0.002	+
الانبوبة 24	**0.001**	+
الانبوبة 25	0.0005	+

+ : موجبة النمو

- : سالبة النمو

2.5.2. دراسة الفعالية التآزرية لمستخلص قشور الرمان مع المضاد الفطري AmB

أُضيف التركيز 0.001 مايكروغرام / مل من المضاد الفطري AmB (وهو التركيز الاقل من التركيز المثبط الادنى) الى المستخلص بتراكيزه الاربعة (100 ,75 , 50 ,25) ملغم/مل وحُضنت

الاطباق لمدة 24 ساعه وبدرجة حرارة 37 مْ لمعرفة منطقة التثبيط ، و الفعالية التازرية للمضاد الفطري مع المستخلص النباتي .

6.2. التحليل الاحصائي Statistical analysis

أُستخدم برنامج التحليل الاحصائي الجاهز Statistical analysis system (SPSS) اصدار 25 وقورنت المتوسطات باستعمال L.S.D وعلى مستوى احتمالية 0.01 .

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

Results & Discussion

3. النتائج والمناقشة Results and Discussion

1.3.عزل وتشخيص الخمائر

1.1.3. جمع العينات

تضمنت الدراسة الحالية جمع 50 عينة من المسحات المهبلية ، و 25 عينة ادرار للنساء في مدينة كربلاء المقدسة اللاتي يعانين من الالتهابات المهبلية والتهابات المجاري البولية . وكانت عدد العزلات المهبلية موجبة النمو (ذات النمو الفطري) 30 عزلة اي بنسبة 60 % وعزلات سالبة النمو (النمو غير الفطري) كان 20 عزلة اي بنسبة 40 % . اما بالنسبة لعزلات الإدرار التي كانت موجبة النمو (ذات النمو الفطري) 11 عزلة اي بنسبة 44 % وعزلات سالبة النمو (النمو غير الفطري) كانت 14 عزلة اي بنسبة 56 % .

سُجلت النتائج في الدراسة الحالية ظهور *C. albicans* بأعلى نسبة في كل من *Candida glabrata* و *Candida tropical* و *Candida kefyr* في عينات الادرار و عينات المهبل بعدد عزلات 26 عزلة من اصل 41 عزلة وبنسبة 63.4 % . بينما بقية العزلات موضحة في الجدول (3-1) .

تتفق النتائج الحالية مع كل من Vázquez-González, *et al.*, (2013) و Nurat, *et al.*, (2016) ان الخمائر تتواجد في منطقة المهبل بشكل نبيت طبيعي وتصبح ممرضة في بعض الحالات مثل : ضعف المناعة والحمل.

تتفق الدراسة الحالية مع ما وجد من دراسات سابقه ؛ اذ اشار Nurat, *et al.*, (2016) ان نوع خميرة *C. albicans* هو النوع الأكثر انتشارًا ، وهي التي تستحث الاصابة المهبلية ؛ وذلك لوجود بعض عوامل الضراوة التي اسهمت في حدوث الاصابة.

جدول (3-1) النسبة المئوية لعزلات خمائر *Candida* spp. المعزولة من المسحات المهبلية والادرار

مصدر العزلة	*Candida* spp.	عدد العزلات	النسبة المئوية %
المسحات المهبلية	*C. albicans*	19	38
	C. galabrata	8	16
	C. topicalis	3	6
المجموع الكلي للعزلات الفطرية في المسحات		30	60
المجموع الكلي للعزلات غير الفطرية في المسحات		20	40
الادرار	*C.albicans*	7	28
	C.galabrata	2	8
	C.topicalis	1	4
	C.kefyr	1	4
المجموع الكلي للعزلات الفطرية في الادرار		11	44
المجموع الكلي للعزلات غير الفطرية في الادرار		14	56

قُسمت كل العينات تبعا للعمر و الحمل والحالة الاجتماعية في الجداول التالية :

جدول (2-3) النسبة المئوية تبعا للعمر لعزلات خمائر *Candida* spp. المعزولة من المسحات المهبلية والادرار

نوع العزلة	العمر	عدد العزلات	النسبة المئوية %
المسحات المهبلية	35- 25	13	26
	45- 35	8	16
	55- 45	6	12
	55 <	3	6
المجموع الكلي للعزلات في المسحات		30	60
الادرار	35- 25	5	20
	45- 35	3	12
	55- 45	1	4
	55 <	2	8
المجموع الكلي للعزلات في الادرار		11	44

اتفقت هذه النتيجة مع Akortha *et al* ., (2009) و Willacy and Jackson (2011) ، الذين أبلغوا عن ذروة الإصابات المهبلية بين سن 20 و 40 عامًا. واتفقت ايضا مع Emeribe *et al*., (2015) . قد تكون هذه الزيادة في النسبة بسبب النشاط الجنسي المرتفع ، وسوء النظافة الشخصية ، واستخدام موانع الحمل ، واستخدام الادوية بين هذه الفئة العمرية . هؤلاء الذين تتراوح أعمارهم بين 26 و 30 عامًا يمثلون ذروة الإنجاب في المجتمعات ، وكان من بين هذه المجموعة ارتفاع ملحوظ في معدل انتشار داء المبيضات المهبلي. من ناحية أخرى ، فإن التقدم في العمر يقلل من تأثير هرمون الاستروجين لدى النساء ، مما قد يؤدي إلى انخفاض معدلات الإصابة مع تقدم المرأة في العمر.

اما النتائج التي توصل إليها Alo *et al*.(2012)الذين أبلغوا عن انتشار أعلى للإصابة في *C. albicans* بنسبة 33.33 % ضمن الفئة العمرية من 36-40 عامًا ، بينما كان لدى الأشخاص الذين تتراوح أعمارهم بين 20 و 25 عامًا أقل انتشار بنسبة 20.42 % ، وهذا قد يعود الى اختلاف ظروف الدراسة و البلد والعادات والتقاليد وعمر البلوغ والزواج والتركيب الوراثي والبيئي .

جدول (3-3) النسبة المئوية تبعا للحمل لعزلات خمائر *Candida* spp. المعزولة من المسحات المهبلية والادرار

نوع العزلة	الحالة	العدد	النسبة المئوية %
المسحات المهبلية	حامل	20	45
	غير حامل	10	15
المجموع الكلي للعزلات في المسحات		30	60
الادرار	حامل	7	28
	غير حامل	4	16
المجموع الكلي للعزلات في الادرار		11	44

ان زيادة نسبة داء المبيضات المهبلي (VVC) عند النساء الحوامل هي بسبب التغيرات المناعية ، وزيادة مستويات هرمون الاستروجين ، و زيادة آلية إنتاج الكلايكوجين المهبلي . (Gonçalves *et al*. ,2016)

جدول (3- 4) النسبة المئوية تبعا للحالة الاجتماعية لعزلات خمائر *Candida* spp. المعزولة من المسحات المهبلية والادرار

نوع العزلة	الحالة	العدد	النسبة المئوية %
المسحات المهبلية	متزوجة	22	44
	غير متزوجة	8	16
المجموع الكلي للعزلات في المسحات		30	60
الادرار	متزوجة	8	32
	غير متزوجة	3	12
المجموع الكلي للعزلات في الادرار		11	44

قد تكون هذه الزيادة في النساء المتزوجات بسبب استخدام موانع الحمل التي تعمل على زيادة هرمون الاستروجين ؛ بحيث كلما زادت نسبة الاستروجين في جسم المرأة زادت معها احتمالية تكاثر خمائر المبيضات مسببة الاصابة ، علما ان هرمون الاستروجين بشكل خاص يسبب زيادة في مستوى السكر في الافرازات المهبلية ، وعليها تنمو وتتكاثر الخميرة ، وهذا هو السبب في ان النساء المتزوجات اللواتي يتناولن حبوب منع الحمل ، معرضات اكثر من غيرهن للإصابة بالتهابات المهبل الفطرية ، لان يهيئ الجو الدافئ والرطب لتكاثر الفطريات .اتفقت هذه النتيجة مع دراسة سابقة (Sultan and Zghair , 2020) .

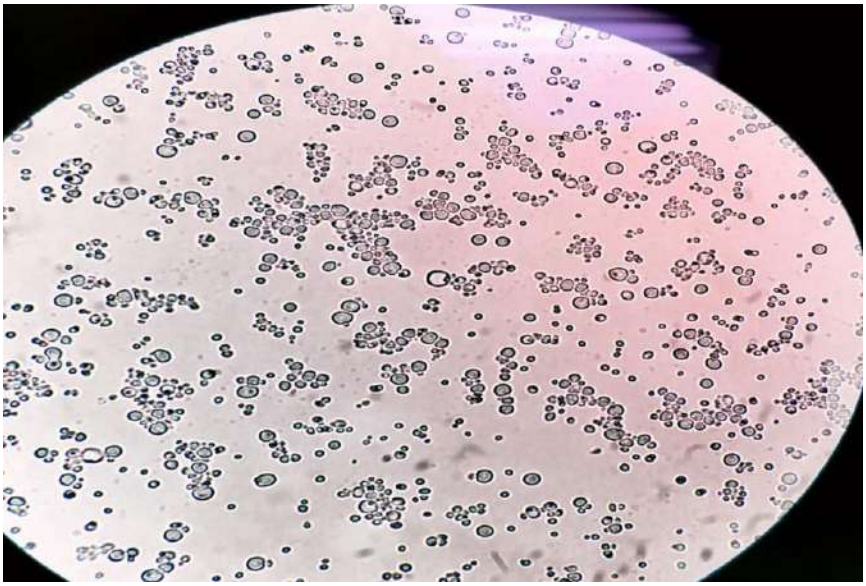
2.1.3.التشخيص المظهري (الصفات الزرعية والمجهرية)

Morphological identification (Cultural and Microscopical characteristic)

بعد زرع كل العينات التي تم الحصول عليها (عينات الادرار وعينات المسحات المهبلية) على وسط SDA ، وحضنها بدرجة حرارة 37 مْ ولمدة (24 -48 ساعة) ؛ كان نمو مستعمرات خمائر المبيضات بصورة سريعة وواضحة وذات لون كريمي مصفر . ان مستعمرات انواع المبيضات كانت ناعمة و لامعة و جافة ؛ (الشكل 4-1). وقد اتفقت هذه الدراسة مع ما وجده Bhavan *et al.* (2010) .

الشكل (3-1) نمو مستعمرات المبيضات على وسط SDA بعد 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 مْ

ان الفحص المباشر بالمجهر الضوئي كما في الشكل (3-2) لتعريف الخيوط الحقيقية ، والكاذبة ، والابواغ والبراعم للخمائر ؛ معظم الانواع تكون مدورة او طويلة بالشكل . الانواع التي تنتج الخيوط الكاذبة تكون طويلة ، ومنحنية ومتفرعة ؛ الخيوط الحقيقية والسبورات الكلاميدية تنتج من بعض انواع المبيضات . بينما الفحص المجهري تظهر الخميرة بشكل خيوط كاذبة متفرعة مع خلايا وحيدة الخلية صغيرة (Calderone , 2002) .



الشكل (3-2) خلايا المبيضات تحت المجهر الضوئي بقوة x 40

3.1.3.التشخيص بوساطة جهاز الفايتك Identification by VITEC_2 system

نظـــام الفايتـــك (bioMérieux, Inc., Hazelwood, MO) هـــو نظـــام اوتومـــاتيكي (تلقـــائي) بالكامـــل يســـمح بتشـــخيص الأنـــواع واختبـــار حساســـية المضـــادات ضـــد الفطريـــات (Pfaller *et al.*, 2007; Revankar *et al.*, 1998).

شُخصت جميع العينات التي تم الحصول عليها ، والتي شخصت مبدئيا بالتشخيص المجهري والزرعي (Sood, 1994 ; Morello *et al* ., 2003 ; Singh *et al.*, 2013) ، وبعدها شخصت بنظام الفايتك وكانت احتمالية التشخيص بهذا النظام تتراوح بين 95 % - 99 % ؛ الجدول (3-5) فقد اكدت دراستنا الحالية دقة ، وسرعة نظام الفايتك في تشخيص العديد من الاحياء المجهرية التي منها الخمائر مقارنة بطرق التشخيص التقليدية ، وقد اتفقت هذه الدراسة مع Mondelli *et al.*, (2012) فيجب العمل بهذا النظام في التشخيص المختبري للأحياء المجهرية وفي كل المختبرات الروتينية . وإما دراسة Ligozzi *et al.*, (2002)، التي أثبتت تطور هذه التقنية بحيث يمكنها أيضا تشخيص المضاد لكل كائن مجهري ممرض بوساطة كارت للحساسية .

جدول (3 - 5) انواع المبيضات التي شخصت بنظام الفايتك ونسبة الاحتمالية لكل نوع

ت	انواع المبيضات	نسبة الاحتمالية
1	*C. albicans*	% 99 - 90
2	*C. galabrata*	% 99 - 95
3	*C. tropicalis*	% 99 - 97
4	*C. kefyr*	% 99

2.3. حساسية المبيضات للمضادات الفطرية

استخدم نظام الفايتك لتحديد حساسية عزلات انواع المبيضات تجاه العديد من المضادات الفطرية ؛ وكما موضح في الجدول (3- 6) وقُيمت حساسية العزلات بقياس التركيز المثبط الادنى للمضادات الفطرية (MIC) .

تعد قدرة المبيضات على تكوين الأغشية الحيوية المقاومة للأدوية عاملاً مهمًا في مساهمتها في المرض الذي يصيب الإنسان . مثل معظم الأغشية الحيوية الميكروبية (Rajendran *et al.*, 2010) ، تكون الخلايا الثابتة (Sessile cell) داخل الأغشية الحيوية في *C.albicans* أقل عرضة للعوامل المضادة للميكروبات من الخلايا العوالق (Planktonic cells) (Sardi *et al.*, 2013).

جدول (3- 6) حساسية انواع المبيضات للمضادات الفطرية المختلفة

ت	المضادات / المبيضات	FLZ	VCZ	CASP	MCF	AmB	5-FC
1	*C.albicans*	R-S	R-S	R-S	R-S	R-S	R-S
2	*C.galabrata*	-	S	I-S	S	I-S	S
3	*C.tropicalis*	S	S	S	S	S	S
4	*C.kefyr*	-	S	-	-	R	S

Resistance : R وتعني العزلات كانت مقاومة للمضاد الفطري

Sensative : S وتعني ان العزلات كانت حساسة للمضاد الفطري

Intermediate : I و تعني ان العزلة متوسطة الحساسية للمضاد الفطري

- : الحقول الفارغة وتعني ان المضاد الفطري لا يعمل على الخميرة

3.3. تأثير المستخلصات النباتية المختلفة على نمو خمائر المبيضات

أظهرت نتائج الدراسة الحالية بان هناك تأثير تثبيطي لكل من المستخلصات النباتية المدروسة . أن مستخلص البلوط كان له فاعلية مضادة واسعة الطيف على عزلات المبيضات المقاومة والحساسة ؛ وتعزى هذه الفاعلية الى وجود مركبات التانينات التي تتركز في ثمرة شجرة البلوط اكثر من الاجزاء الاخرى (Chusri, *et al*,.2012) . اما قشور الرمان فقد اعطى ايضا فاعلية مضادة واسعة الطيف ؛ وذلك يعود الى وجود العديد من المركبات الفعالة حيويا الموجودة في قشور الثمرة (Alexandre *et al.*, 2019) .

1.3.3. تأثير المستخلص الكحولي لنبات البلوط على المبيضات

اظهرت النتائج بان المستخلص الكحولي لنبات البلوط اعطى فاعلية تثبيطية جيدة عند تركيز 100 ملغم / مل فقد كان معدل التثبيط 6.66 ملم على خميرة *C.albicans* في حين اظهر نفس التركيز معدل تثبيط اعلى 7.00 ملم على خميرة *C.glabrata* واقل منه كان على خميرة *C. tropicalis* بمعدل تثبيط 5.33 ملم ، في حين كان اقل معدل تثبيط والذي بلغ 4.33 ملم على خميرة *C.kefyr* . الجدول (3-7) والشكل (3-3) و (3-4) اذ جاءت هذه النتائج متوافقة مع دراسة Sultan and Zghair (2020).

اما عند تركيز 75 ملغم / مل فقد كان اعلى معدل تثبيط على خميرة *C.glabrata* ، والذي بلغ 5.33 ملم في حين كان اقل معدل تثبيط 3.00 ملم على خميرة *C.kefyr* وجاء معدل تثبيط 4.00 ملم وسطا بين هاتين القيمتين لكل من خميرة *C.albicans* و خميرة *C. tropicalis* . الجدول (3-11) والشكل (3-3) .

اعطى تركيز 50 ملغم / مل للمستخلص فاعلية اقل من تركيز 75 ملغم / مل فقد كان اعلى معدل تثبيط على خميرة *C.glabrata* ، والذي بلغ 3.67 ملم واقل معدل تثبيط كان 1.83 ملم على خميرة *C.kefyr* وجاءت بقية القيم وسطا بين هاتين القيمتين ، فقد كان معدل تثبيط 2.33 ملم على خميرة *C.albicans* المقاومة للمضادات ومعدل تثبيط 3.00 ملم كان على خميرة *C. tropicalis* . الجدول (3-11) والشكل (3-3) .

اما تركيز 25 ملغم / مل اعطى معدل تثبيط 1.16 ملم على خميرة *C.albicans* المقاومة للمضادات في حين اظهر نفس التركيز معدل تثبيط اعلى قليلا 1.67 ملم على كل من خميرة *C.glabrata* و *C. tropicalis* في حين كان اقل معدل تثبيط ، والذي بلغ 0.81 ملم على خميرة *C.kefyr* . الجدول (3-11) والشكل (3-3) .

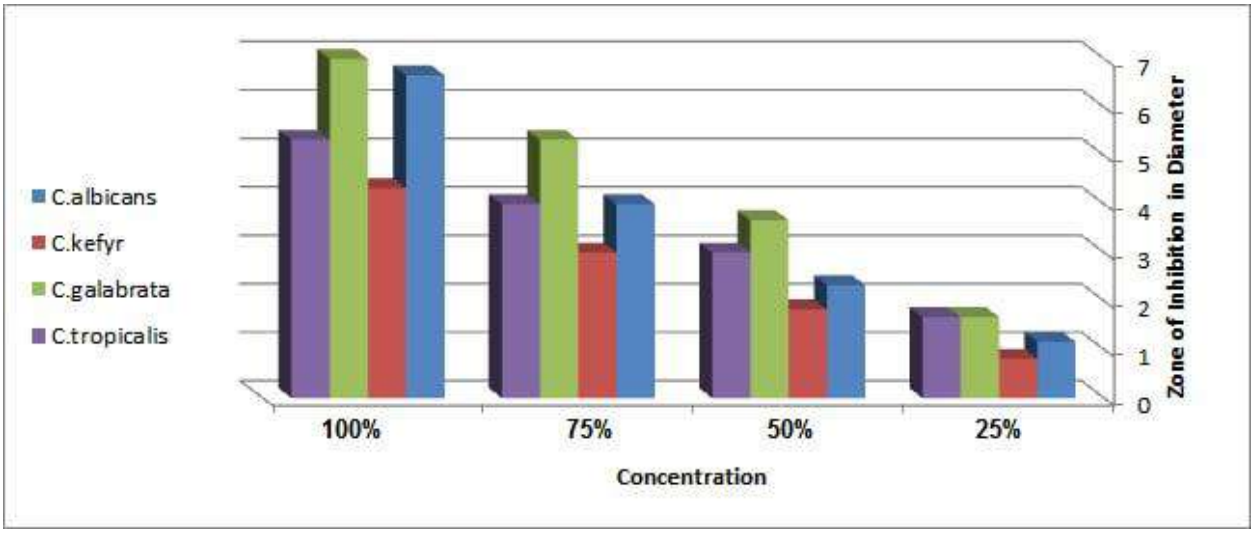
يسمى البلوط محليًا في العراق باسم الجفت ، ويستخدم بشكل بارز من قبل النساء العراقيات ، بعد نقعه أو غليه في الماء ، كمطهر بعد الولادة. كشفت العديد من الدراسات عن النشاط المضاد للميكروبات لأجزاء مختلفة من أنواع البلوط (Cheynier, 2012 ; Welter *et al*., 2012 ; Meziti *et al*., 2019) .

اظهرت دراسات سابقة عند التحليل الكيميائي النباتي لمستخلصات البلوط وجود معظم قلويدات التمثيل الغذائي الثانوية ، المجموعة الأمينية الحرة ، الكلايكوسيدات ، الفينولات ، الصابونين والتانين ، (Joshi & Juyal , 2017) .

وكذلك اظهرت دراسة سابقة ان للبلوط فاعلية مضادّة للفطريات ضد داء المبيضات المهبلي (Moshfeghy *et al*., 2018 ;) . وكذلك أظهرت دراسات سابقة الفعالية المضادة للفطريات ضد المبيضات البيضاء (*C. albicans*) من المستخلص الايثانولي لبلوط *Q. infectoria* . تتركز تانينات (الإيلاجيتانين) في ثمرة شجرة البلوط أكثر من الأجزاء الأخرى من أشجار البلوط ، ويمكن أن تعزى الفعالية المضادة للبكتيريا والفطريات إلى هذه المركبات (Chusri, *et al*,. 2012) .

جدول (3-7) تأثير التراكيز المختلفة من مستخلص البلوط على انواع *Candida* spp. والتداخل بينهما في منطقة التثبيط (ملم) .

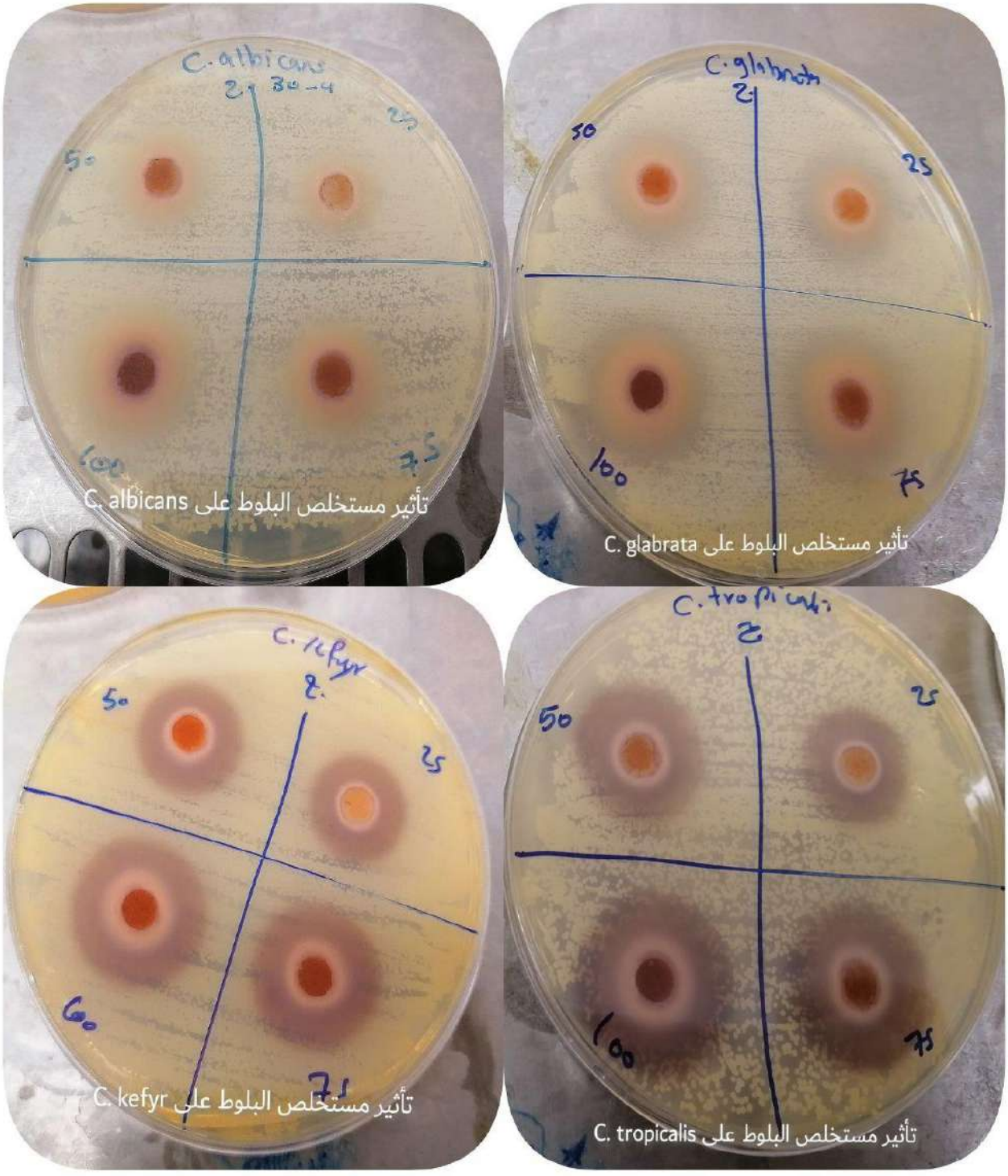
التركيز ملغم/مل / الخمائر	25	50	75	100	معدل تأثير الخميرة
C.albicans	1.16	2.33	4.00	6.66	**3.54**
C.kefyr	0.81	1.83	3.00	4.33	**2.50**
C.galabrata	1.67	3.67	5.33	7.00	**4.41**
C.tropicalis	1.67	3.00	4.00	5.33	**3.50**
معدل تأثير التركيز	**1.33**	**2.77**	**4.08**	**5.83**	**-**
L.S.D. 0.01	**الخميرة = 1.47** **التركيز= 1.36**				



الشكل(3-3) تأثير التداخل الثنائي لمستخلص البلوط على انواع *Candida*

اظهرت نتائج الدراسة الحالية بان افضل معدل تأثير التركيز هو 100 % حيث معدل التركيز 5.83 وهو اكثر معنوية من التركيز 25 و 50 و75 ؛ اذ سجلت 1.33 و2.77 و 4.08 على التوالي اذ كانت قيمة L.S.D. 1.36 .

اظهرت النتائج الحالية بان افضل معدل تأثير الخميرة هو *C.galabrata* ؛ اذ سجلت معدل 4.41 ملم ، وهو اكبر من معدل التأثير للخمائر *C.albicans* و *C.kefyr* و *C.tropicalis* ؛ اذ سجلت معدل تأثير 3.54 و 2.50 و 3.50 على التوالي . لا توجد فروقات معنوية بين معدل تأثير خميرة *C.galabrata* مع الخميرتين *C.albicans* و *C.tropicalis* ؛ وذلك لأنه قيمة الفرق بين المعدلات اصغر من قيمة L.S.D. والتي تساوي 1.47 .



الشكل (3- 4) تأثير مستخلص البلوط على خمائر *Candida*

2.3.3. تأثير المستخلص الكحولي لقشور الرمان على المبيضات :

اظهرت نتائج دراستنا بان المستخلص الكحولي لقشور الرمان فاعلية تثبيطية عالية جدا ضد الخمائر المدروسة . اظهر تركيز 100 ملغم / مل للمستخلص فاعلية تثبيطية عالية جدا ، فقد كان معدل التثبيط 9.67 ملم على خميرة *C.albicans* المقاومة للمضادات في حين اظهر نفس التركيز معدل تثبيط اعلى 13.67 ملم على خميرة *C.glabrata* واقل منه كان على خميرة *C. tropicalis* بمعدل تثبيط 8.67 ملم . في حين كان اقل معدل تثبيط والذي بلغ 6.33 ملم على خميرة *C.kefyr* . الجدول (3-8) والشكل (3-5) و(3-6) . وجاءت دراستنا متوافقة مع دراسة سابقة ايسر و هيام (2017) ,Abdealsiede *et al.* (2020).

اما تركيز 75 ملغم / مل فكان على معدل تثبيط ايضا على خميرة *C.glabrata* ، والذي بلغ 10.33 ملم ، واقل معدل تثبيط على خميرة *C.kefyr* بمعدل تثبيط 4.67 ملم وجاء وسطا بين القيمتين معدل تثبيط كل من خميرة *C.albicans* وخميرة *C. tropicalis* ، والذي بلغ 6.33 ملم . الجدول (3-8) والشكل (3-5) و(3-6).

في حين اظهر تركيز50 ملغم / مل اعلى معدل تثبيط على خميرة *C.glabrata* ، والذي بلغ 9.00 ملم واقل معدل تثبيط على خميرة *C.kefyr* بمعدل تثبيط 3.33 ملم اما معدل تثبيط خميرة *C.albicans* كان 4.33 ملم ، ومعدل التثبيط 5.00 ملم لخميرة *C. tropicalis* ؛ الجدول (3-8) والشكل (3-5) و(3-6).

اما تركيز 25 ملغم / مل معدل تثبيط 2.67 ملم على خميرة *C.albicans* في حين اظهر نفس التركيز معدل تثبيط عالي 6.67 ملم على خميرة *C.glabrata* ، وكان معدل تثبيط 3.67 ملم لخميرة *C. tropicalis* في حين كان اقل معدل تثبيط ،والذي بلغ 1.67 ملم على خميرة *C.kefyr* . الجدول (3-8) والشكل (3-5) و(3-6).

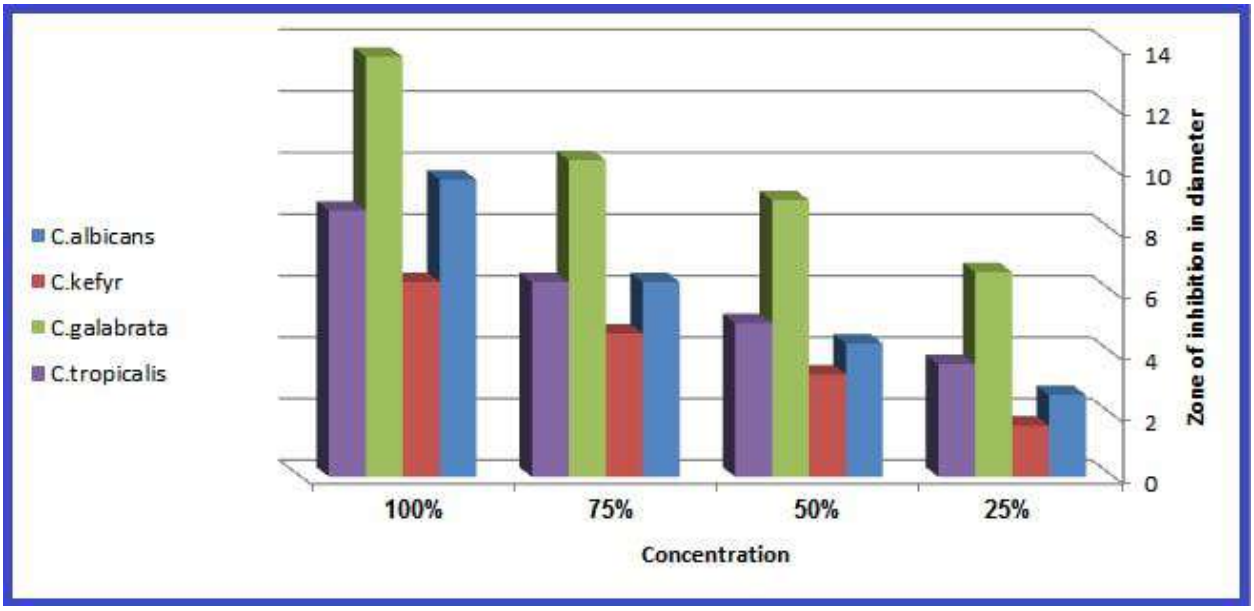
اظهرت دراسات سابقة ان فعالية قشور الرمان تعود الى المركبات الفعالة الموجودة في الرمان ؛ اذ حددت دراسات سابقة العديد من المركبات الفعالة حيويًا ذات الفعالية المضادة للأكسدة في قشور الرمان مثل الأحماض العضوية و الفينولية (Organic and Phenolic acid) و الفلافونويد (Flavonoids) ،

و الستيرول (Sterols) ، و التريتربينويد (Triterpenoids) ، و القلويدات (Alkaloids) و التانينات (Tannins) (Entessar *et al.* , 2012 ; Al-Rawahi *et al.* , 2014) .

وكذلك اكدت المصادر المختلفة على أن قشور الرمان لها فعالية مضادة لكل من البكتيريا ، و الالتهابات ، و الفيروسات و الفطريات (Singh *et al.* , 2002 ; Bhandari , 2012) .

جدول (3- 8) تأثير التراكيز المختلفة من مستخلص قشور الرمان على انواع *Candida* spp. والتداخل بينهما في منطقة التثبيط (ملم) .

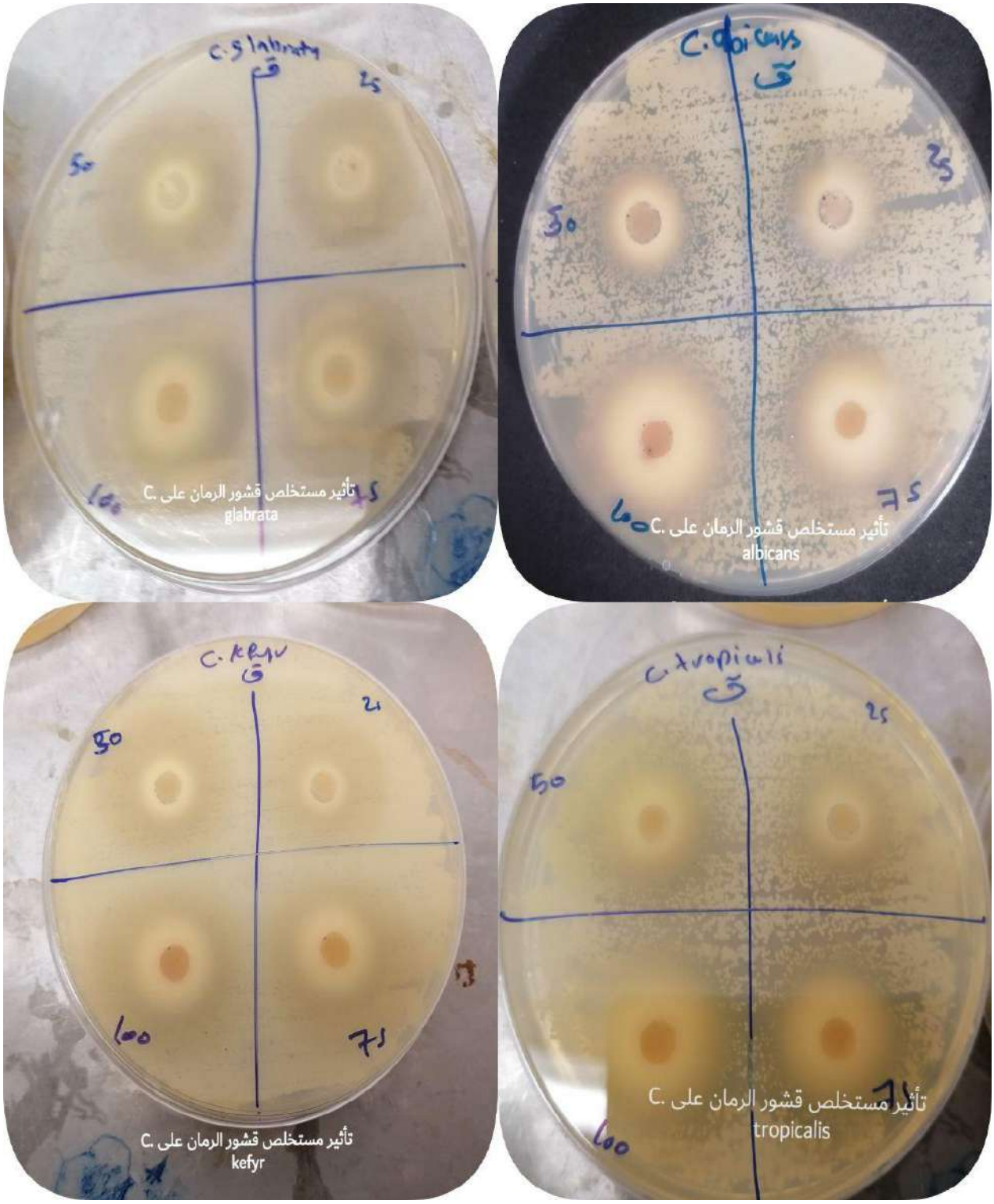
التركيز ملغم/مل / الخمائر	25	50	75	100	معدل تأثير الخميرة
C.albicans	2.67	4.33	6.33	9.67	**5.75**
C.kefyr	1.67	3.33	4.67	6.33	**4.00**
C.galabrata	6.67	9.00	10.33	13.67	**9.92**
C.tropicalis	3.67	5.00	6.33	8.67	**5.92**
معدل تأثير التركيز	**3.67**	**5.42**	**6.92**	**9.59**	**-**
L.S.D. 0.01	**الخميرة = 1.69** **التركيز= 1.75**				



الشكل (3-5) تأثير التداخل الثنائي لمستخلص قشور الرمان على انواع *Candida* .

اظهرت نتائج الدراسة الحالية بان افضل معدل تأثير التركيز هو 100 % حيث معدل تأثير التركيز 9.59 وهو اكثر معنوية من التركيز 75 و 50 و25 حيث سجلت 6.92 و 5.42 و 3.67 على التوالي ، اذ كانت قيمة L.S.D = 1.75 .

اظهرت النتائج الحالية بان افضل معدل تأثير الخميرة هو *C.galabrata* ؛ اذ سجلت معدل 9.92 ملم وهو اكبر من معدل التأثير لخميرة *C.albicans* و *C.kefyr* و *C.tropicalis* ؛ اذ سجلت معدل تأثير 5.75 و 4.00 و 5.92 على التوالي . توجد فروقات معنوية بين معدل تأثير خميرة *C.galabrata* مع بقية الخمائر ؛ وذلك لأنه قيمة الفرق بين المعدلات اكبر من قيمة L.S.D. والتي تساوي L.S.D=1.69 .



الشكل (3-6) تأثير مستخلص قشور الرمان على انواع *Candida* .

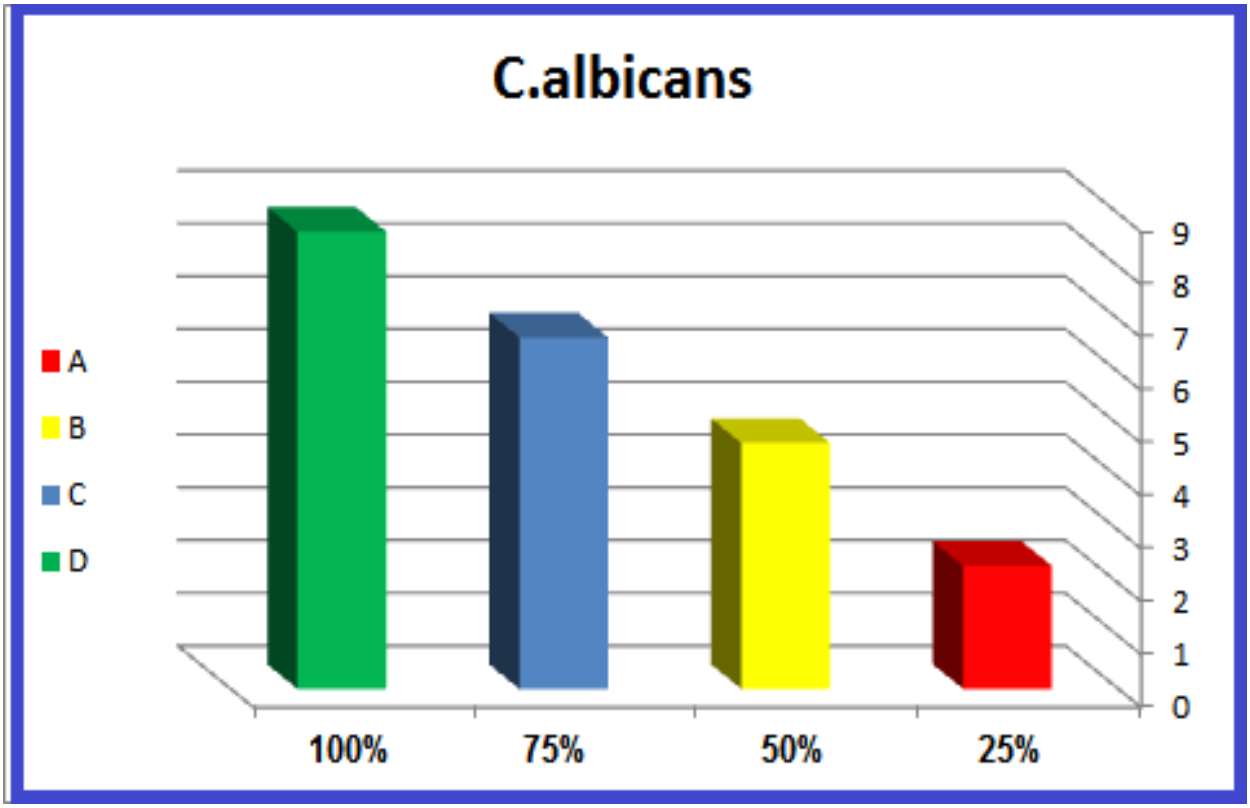
3.3.3. تأثير مزج مستخلص قشور الرمان مع مستخلص البلوط على خميرة *C.albicans* المقاومة للمضادات الفطرية

عند مزج مستخلص البلوط مع مستخلص قشور الرمان اعطى فاعلية تثبيطية اعلى من البلوط وحده واقل من الرمان وحده لكل التراكيز المستخدمة على خميرة *C.albicans* المقاومة للمضادات الفطرية . اذ بلغت اعلى معدل تثبيط 8.66 ملم بتركيز 100 ملغم /مل ، واقل معدل تثبيط كان 2.33 ملم بتركيز 25 ملغم/ مل ؛ وجاءت بقية المعدلات وسطا بين القيمتين . فقد كان تركيز 50 ملغم / مل بمعدل تثبيط 4.66 ملم في حين بلغ معدل التثبيط بتركيز 75 ملغم / مل 6.66 ملم . الجدول (3-9) وجاءت دراستنا مشابهة من ناحية مزج المستخلصان قشور الرمان والبلوط لدراسة Zghair (2018) .

تُستخدم اجزاء نباتية مختلفة او انواع مختلفة من النبات معا لتحقيق نفس الهدف مع فعالية كبيرة. في الواقع يعتقد ان العلاجات العشبية لها ميزة الجمع بين المكونات الفعالة للحصول على تأثيرات تآزرية او اضافية تعطي للنبات كفاءة اعلى من بعض المكونات المعزولة (van Vuuren and Viljoen , 2011) .

جدول(3-9) تأثير التداخل بين مستخلص قشور الرمان ومستخلص البلوط في تثبيط نمو خميرة *C.albicans* المقاومة للمضادات الفطرية .

التركيز (ملغم /مل)	25	50	75	100	معدل تأثير الخميرة
C.albicans	2.33	4.67	6.67	8.66	**5.58**
L.S.D 0.01	**0.79**				



الشكل (3- 7) تأثير التداخل بين المستخلصين قشور الرمان والبلوط على خميرة *C.albicans* في منطقة التثبيط (ملم) .

اظهرت النتائج عند مزج المستخلصين معا ، فان افضل معدل تثبيط هو بتركيز 100 % ؛ اذ سجل 8.66 ملم وهو اكبر من تركيز 25 و 50 و 75 ؛ اذ سجل معدل تثبيط 2.33 و 4.67 و 6.67 ملم على التوالي .

وكانت قيمة L.S.D تساوي 0.79 ، وبذلك هناك فروقات معنوية في كل التراكيز.

4.3.4.تاثير مزج المستخلص الكحولي لقشور الرمان مع المضاد الفطري AmBعلى خميرة *C.albicans* المقاومة للمضادات الفطرية

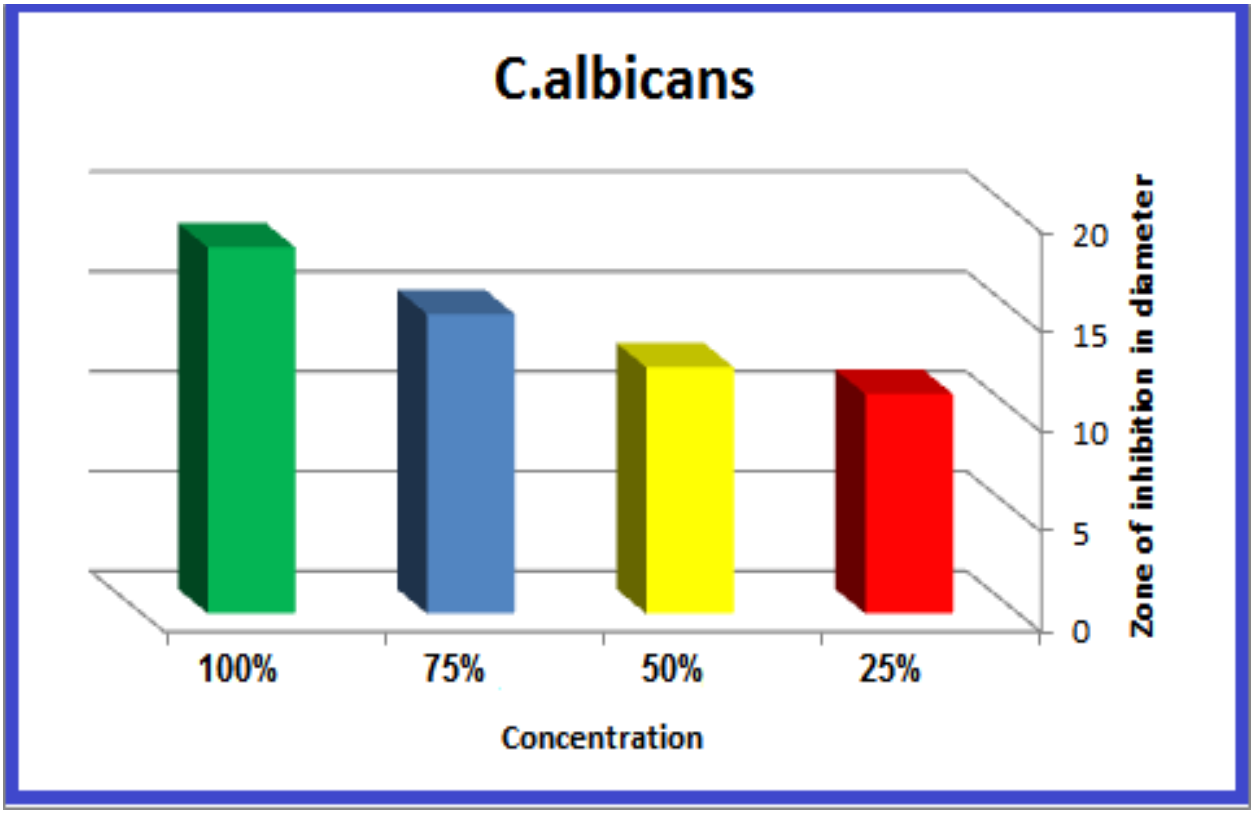
اظهرت نتائج دراستنا الحالية ان مزج مستخلص قشور الرمان مع المضاد الفطري AmBاعطى فاعلية تآزرية تثبيطية عالية على خميرة *C.albicans* المقاومة للمضادات. في هذه التجربة تم تثبيت تركيز المضاد على 0.001 مايكرو غرام /مل ، وتغيير تركيز المستخلص لأربع تراكيز(25 ،50 ، 75 ، 100) ملغم /مل .

اذ بلغ معدل تثبيط 11.00 ملم بتركيز 25 ملغم /مل ، وكان معدل التثبيط بتركيز 50 ملغم /مل هو 12.33 ملم اما عند تركيز 75 ملغم /مل ، فكان معدل التثبيط 15.00 ملم اما معدل التثبيط العالي كان بتركيز 100 ملغم /مل ، فقد بلغ معدل التثبيط 18.33 ملم (Majid *et al.*, 2010 ; Salih , 2016) . وكما موضح في الجدول (3-10) و الشكل (3-8) و (3-9) .

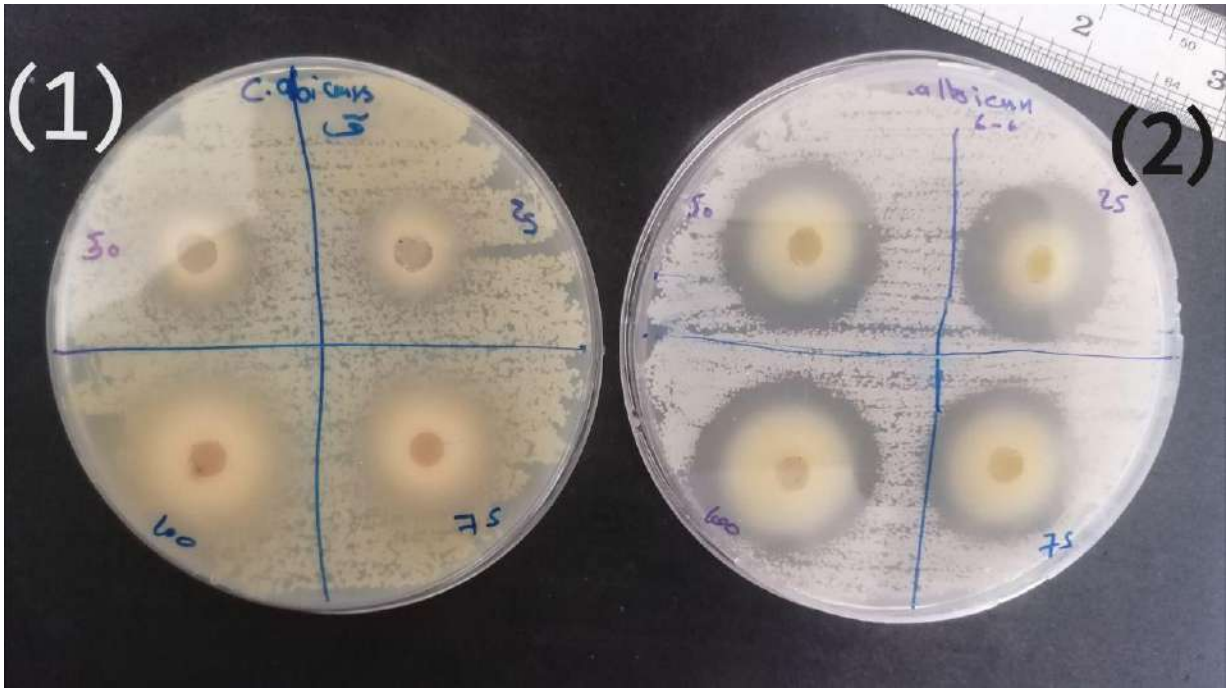
آلية عمل AmB هو الارتباط مع الارغوستيرول لغشاء البلازما في الخلية الفطرية مما يسبب خللاً وظيفيًا عن طريق تشكيل القنوات الأيونية (Hartsel *et al.*, 1993 ; Shimizu *et al.*, 2010 ; Mesa-Arango *et al.*, 2012 ; Gray *et al.*, 2012 ; Stone *et al.*, 2016) .

جدول (3-10) التداخل بين مستخلص قشور الرمان والمضاد الفطري AmB لخميرة *C. albicans* في منطقة التثبيط (ملم)

التراكيز / الخميرة	25	50	75	100	معدل تأثير الخميرة
C.albicans	11.00	12.33	15.00	18.33	**14.16**
L.S.D 0.01	**الخميرة = 2.25**				



الشكل (3-8) تأثير التداخل بين المضاد الفطري AmB ومستخلص قشور الرمان على خميرة *C. albicans* في منطقة التثبيط (ملم) .



الشكل (3-9) 1 - يبين تأثير المستخلص الكحولي لقشور الرمان على خميرة *C. albicans* المقاومة للمضادات الفطرية

2- يبين التأثير التآزري للمستخلص الكحولي لقشور الرمان مع المضاد الفطري AmB على خميرة *C. albicans* المقاومة للمضادات الفطرية

5.3.3. تأثير المستخلص الكحولي لأوراق الشاي الاخضر على خمائر المبيضات

سجلت نتائج الدراسة الحالية ان الشاي الاخضر لم يكن له اي فاعلية مضادة تجاه الخمائر المدروسة المقاومة والحساسة وبكل التراكيز المستخدمة ، ولم تتفق نتائجنا مع دراسة Ghorbani *et al.*, (2018).

الإستنتاجات والتوصيات

Conclusions

&

Recommendations

الاستنتاجات :

1. ان خمائر *Candida* spp. تترافق مع النساء اللاتي يعانين من التهاب المجاري البولية و التناسلية في افرازات المهبل والبول وقد كانت خميرة *C. albicans* في طليعة الانواع المعزولة .
2. تزداد الاصابة لدى النساء المتزوجات واللاتي بعمر 25 الى 35 سنة .
3. أظهرت بعض انواع المبيضات المعزولة مقاومة للمضادات الفطرية عند فحصها بجهاز VITEK.
4. اظهرت المستخلصات الكحولية للبلوط والرمان قدرة تثبيطية ضد انواع المبيضات المعزولة في حين كان المستخلص الكحولي للشاي الاخضر غير مؤثر معنويا .
5. ان التداخل بين مستخلص قشور الرمان مع المضاد الفطري AmB اعطى افضل نتائج للتثبيط .

التوصيات:

1. على النساء الحوامل واللاتي بعمر 25 الى 35 سنة اخذ الحيطة والحذر ومراجعة المراكز الصحية كونهن الاكثر عرضة للإصابة بداء المبيضات (VVC) .
2. نظرا لوجود عزلات مقاومة للمضادات الفطرية لابد من عدم اخذ المضادات بشكل عشوائي بل يجب ان تكون بأشراف الاطباء المختصين وبعد اجراء فحص الحساسية .
3. يمكن استخدام المستخلصات الكحولية للرمان والبلوط في تصنيع علاجات لداء المبيضات المهبلي بعد التأكد من عدم وجود تأثيرات جانبية لها .
4. نظرا لعدم فعالية المستخلص الكحولي للشاي الاخضر يجب استبعاده من كونه قد يدخل في صنع عقاقير مضادة لداء المبيضات (VVC) .
5. يمكن اجراء عملية التداخل بين مستخلص قشور الرمان والمضاد الفطري فلوكونازول لاجل علاج لداء المبيضات لكن يجب ان تكون التراكيز ضمن الحدود المسموح بها وان لا يكون لها تاثيرات جانبية سلبية .

المصادر

References

المصادر العربية :

الغزالي ، ليندا حميد تركي (2012) . دراسة الفعل التثبيطي لبعض المستخلصات النباتية ضد بعض الفطريات الجلدية Dermatophytes

ايسر عاشور خلف , & هيام عبد الرضا العواد (2017) . Antifungal Activity Evalution of Punica granatum L. Extract against *Candida albicans. journal of kerbala university*, 15 (2) .

المصادر الاجنبية :

Abdealsiede, M. M. S., Alrasheid, A. A., Omar, M. M. A., & Elbashir, A. A. (2020). Antimicrobial and Antioxidant Activity of Pomegranate Peel Extracts Obtained by Sequential Extraction Method. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, *8*(2), 14-20.

Aittakorpi, A., Kuusela, P., Koukila-Kähkölä, P., Vaara, M., Petrou, M., Gant, V., & Mäki, M. (2012). Accurate and rapid identification of Candida spp. frequently associated with fungemia by using PCR and the microarray-based Prove-it Sepsis assay. *Journal of clinical microbiology*, *50*(11), 3635-3640.

Akins, R. A. (2005). An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in Candida albicans. *Medical mycology*, *43*(4), 285-318.

Akortha, E. E., Nwaugo, V. O., & Chikwe, N. O. (2009). Antifungal resistance among Candida species from patients with genitourinary tract infection isolated in Benin City, Edo state, Nigeria. African Journal of Microbiology Research, 3(11), 694-699.

Alexandre, E. M., Silva, S., Santos, S. A., Silvestre, A. J., Duarte, M. F., Saraiva, J. A., & Pintado, M. (2019). Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts performed by high pressure and enzymatic assisted extraction. *Food research international*, *115*, 167-176.

Ali, S. I., El-Baz, F. K., El-Emary, G. A., Khan, E. A., & Mohamed, A. A. (2014). HPLC-analysis of polyphenolic compounds and free radical scavenging activity of pomegranate fruit (Punica granatum L.). *Int J Pharm Clin Res*, *6*(4), 348-355.

Alo, M. N., Anyim, C., Onyebuchi, A. K., & Okonkwo, E. C. (2012). Prevalence of asymptomatic co-infection of candidiasis and vaginal trichomoniasis among pregnant women in Abakaliki, South-Eastern Nigeria. *Prevalence*, *2*(7), 87-91.

Al-Rawahi, A. S., Edwards, G., Al-Sibani, M., Al-Thani, G., Al-Harrasi, A. S., & Rahman, M. S. (2014). Phenolic constituents of pomegranate peels (Punica granatum L.) cultivated in Oman. *European Journal of Medicinal Plants*, 315-331.

Arastehfar, A., Daneshnia, F., Hafez, A., Khodavaisy, S., Najafzadeh, M. J., Charsizadeh, A., ... & Boekhout, T. (2020). Antifungal susceptibility, genotyping, resistance mechanism, and clinical profile of Candida tropicalis blood isolates. *Medical mycology*, *58*(6), 766-773.

Arfiputri, D. S., Hidayati, A. N., Handayani, S., & Ervianti, E. (2018). Risk factors of vulvovaginal candidiasis in dermato-venereology outpatients clinic of soetomo general hospital, Surabaya, Indonesia. *African journal of infectious diseases*, 12(1S), 90-94.

Asong, J. A., Amoo, S. O., McGaw, L. J., Nkadimeng, S. M., Aremu, A. O., & Otang-Mbeng, W. (2019). Antimicrobial activity, antioxidant potential, cytotoxicity and phytochemical profiling of four plants locally used against skin diseases. *Plants*, *8*(9), 350.

Baginski, M., & Czub, J. (2009). Amphotericin B and its new derivatives-mode of action. *Current drug metabolism*, *10*(5), 459-469.

Barchiesi, F., Tortorano, A. M., Di Francesco, L. F., Cogliati, M., Scalise, G., & Viviani, M. A. (1999). In-vitro activity of five antifungal agents against uncommon clinical isolates of Candida spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *43*(2), 295-299.

Barros, Z. M. P., Salgado, J. M., Melo, P. S., & de Oliveira Biazotto, F. (2014). Enrichment of commercially-prepared juice with pomegranate (Punica granatum L.) peel extract as a source of antioxidants. *Journal of Food Research*, *3*(6), 179.

Basmaciyan, L., Bon, F., Paradis, T., Lapaquette, P., & Dalle, F. (2019). Candida albicans interactions with the host: crossing the intestinal epithelial barrier. *Tissue Barriers*, 7(2), 1612661.

Bassetti, M., Peghin, M., Carnelutti, A., Righi, E., Merelli, M., Ansaldi, F., ... & Viscoli, C. (2017). Clinical characteristics and predictors of mortality in cirrhotic patients with candidemia and intra-abdominal candidiasis: a multicenter study. *Intensive care medicine*, *43*(4), 509-518.

Bastos, G. M., Nogueira, N. A. P., Soares, C. L., Martins, M. R., Rocha, L. Q., & Teixeira, A. B. (2011). In vitro determination of the antimicrobial potential

of homemade preparations based on medicinal plants used to treat infectious diseases. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, *32*(1).

Bhandari, P. R. (2012). Pomegranate (Punica granatum L). Ancient seeds for modern cure? Review of potential therapeutic applications. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, *2*(3), 171.

Bhavan, P. S., Radhakrishnan, S., Seenivasan, C., Shanthi, R., Poongodi, R., & Kannan, S. (2010). Proximate composition and profiles of amino acids and fatty acids in the muscle of adult males and females of commercially viable prawn species Macrobrachium rosenbergii collected from natural culture environments. *International journal of biology*, *2*(2), 107.

Bialkova, A., & Šubík, J. (2006). Biology of the pathogenic yeast Candida glabrata . *Folia microbiologica* , 51(1), 3-20.

Biasi-Garbin, R. P., & Demitto, F. de O., do Amaral RCR, Ferreira MRA, Soares LAL, et al.(2016). *Antifungal potential of plant species from brazilian caatinga against dermatophytes. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, *58*(18), 10-1590.

Borgers, M. (1980). Mechanism of action of antifungal drugs, with special reference to the imidazole derivatives. *Reviews of infectious diseases*, *2*(4), 520-534.

Brajtburg, J., Powderly, W. G., Kobayashi, G. S., & Medoff, G. (1990). Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *34*(2), 183-188.

Calderone, R. A. (2002). Introduction and historical perspecives. In R. A. Calderone, Candida and Candidiasis (pp. 3-13). Washington DC: American Society of Microbiology Press .

Calderone, R. A., & Clancy, C. J. (Eds.). (2011). *Candida and candidiasis*. American Society for Microbiology Press .

Calderone, R. A., & Fonzi, W. A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in microbiology*, 9(7), 327-335.

Cannon, R. D., Lamping, E., Holmes, A. R., Niimi, K., Baret, P. V., Keniya, M. V., ... & Monk, B. C. (2009). Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clinical microbiology reviews*, *22*(2), 291-321.

Cannon, R. D., Lamping, E., Holmes, A. R., Niimi, K., Tanabe, K., Niimi, M., & Monk, B. C. (2007). Candida albicans drug resistance–another way to cope with stress. *Microbiology*, *153*(10), 3211-3217.

Carmona, E. M., & Limper, A. H. (2017). Overview of treatment approaches for fungal infections. *Clinics in chest medicine*, 38(3), 393-402.

Cartea, M. E., Francisco, M., Soengas, P., & Velasco, P. (2011). Phenolic compounds in Brassica vegetables. *Molecules*, *16*(1), 251-280.

Cassone, A. (2015). Vulvovaginal C andida albicans infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 122(6), 785-794.

Castanheira, M., Messer, S. A., Rhomberg, P. R., & Pfaller, M. A. (2016). Antifungal susceptibility patterns of a global collection of fungal isolates:

results of the SENTRY Antifungal Surveillance Program (2013). *Diagnostic microbiology and infectious disease*, *85*(2), 200-204.

Chen, H., Zhou, X., Ren, B., & Cheng, L. (2020). The regulation of hyphae growth in Candida albicans. *Virulence*, 11(1), 337-348.

Cheynier, V. (2012). Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochemistry reviews*, *11*(2), 153-177.

Chu, J. H., Feudtner, C., Heydon, K., Walsh, T. J., & Zaoutis, T. E. (2006). Hospitalizations for endemic mycoses: a population-based national study. *Clinical Infectious Diseases*, *42*(6), 822-825.

Chusri, S., Phatthalung, P. N., & Voravuthikunchai, S. P. (2012). Anti-biofilm activity of Quercus infectoria G. Olivier against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Letters in applied Microbiology*, *54*(6), 511-517.

Cuervo, G., Garcia-Vidal, C., Puig-Asensio, M., Vena, A., Meije, Y., Fernández-Ruiz, M., ... & Grupo de Estudio de Micología Médica (GEMICOMED), Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC); and Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI). (2017). Echinocandins compared to fluconazole for candidemia of a urinary tract source: a propensity score analysis. *Clinical Infectious Diseases*, *64*(10), 1374-1379.

Dania, V. O., Fadina, O. O., Ayodele, M., & Kumar, P. L. (2014). Efficacy of Oryza sativa husk and Quercus phillyraeoides extracts for the in vitro and in vivo control of fungal rot disease of white yam (Dioscorea rotundata Poir). *SpringerPlus*, *3*(1), 1-7.

de Paula Menezes, R., Silva, F. F., Melo, S. G., Alves, P. G., Brito, M. O., de Souza Bessa, M. A., ... & Röder, D. V. D. (2019). Characterization of Candida species isolated from the hands of the healthcare workers in the neonatal intensive care unit. *Medical mycology*, *57*(5), 588-594.

Denning, D. W. (2002). Echinocandins: a new class of antifungal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *49*(6), 889-891.

Dermawan, J. K. T., Ghosh, S., Keating, M. K., Gopalakrishna, K. V., & Mukhopadhyay, S. (2018). Candida pneumonia with severe clinical course, recovery with antifungal therapy and unusual pathologic findings: a case report. *Medicine*, *97*(2).

Desai, C., Mavrianos, J., & Chauhan, N. (2011). Candida glabrata Pwp7p and Aed1p are required for adherence to human endothelial cells . *FEMS yeast research*, *11*(7), 595-601.

Diba, K., Makhdoomi, K., Nasri, E., Vaezi, A., Javidnia, J., Gharabagh, D. J., ... & Fakhim, H. (2018). Emerging Candida species isolated from renal transplant recipients: species distribution and susceptibility profiles. *Microbial pathogenesis*, *125*, 240-245.

Direkze, S., Mansour, M., Rodriguez-Justo, M., Kibbler, C., Gant, V., & Peggs, K. S. (2012). Candida kefyr fungal enteritis following autologous BMT. *Bone marrow transplantation*, *47*(3), 465-466.

Dota, K. F. D., Consolaro, M. E. L., Svidzinski, T. I. E., & Bruschi, M. L. (2011). Antifungal activity of Brazilian propolis microparticles against yeasts

isolated from vulvovaginal candidiasis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2011*.

Dovnik, A., Golle, A., Novak, D., Arko, D., & Takač, I. (2015). Treatment of vulvovaginal candidiasis: a review of the literature. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*, 24(1), 5-7.

Dufresne, S. F., Marr, K. A., Sydnor, E., Staab, J. F., Karp, J. E., Lu, K., ... & Neofytos, D. (2014). Epidemiology of Candida kefyr in patients with hematologic malignancies. *Journal of clinical microbiology*, *52*(6), 1830-1837.

Ebrahimi, A., Khayami, M., & Nejati, V. (2012). Comparison of antimicrobial effect of different parts of Quercus persica against Escherichia coli O157: H7.

Edwards JE (2000). Candida Species . In: Mandell GL , Dolin R ,Bennett JE(eds) Principles and Practice of Infectious Diseases , 5th ed., New York: Churchill-Livingstone . 2656 - 74

Egorove , N.S. (1985) . Antibiotic a scientific approach. Mir poblishers. Moscow. - El-Sissi H.I, and El.Ansary, M.A. (1967). Tannins and polyphenolics of the leaves of Myrtus communis. *Planta midica*. 15.41 – 51 .

Emeribe, A. U., Nasir, I. A., Onyia, J., & Ifunanya, A. L. (2015). Prevalence of vulvovaginal candidiasis among nonpregnant women attending a tertiary health care facility in Abuja, Nigeria. *Research and Reports in Tropical Medicine*, *6*, 37-42.

Entessar, H. A., Al-Mosawe, A. S. I., & Al-Saadi, I. (2012). The Extraction and purification of gallic acid from the pomegranate rind. *Al-Mustanisinyah J Sci*, *23*, 184-92.

Fan, X., Xiao, M., Liao, K., Kudinha, T., Wang, H., Zhang, L., ... & Xu, Y. C. (2017). Notable increasing trend in azole non-susceptible Candida tropicalis causing invasive candidiasis in China (August 2009 to July 2014): molecular epidemiology and clinical azole consumption. *Frontiers in microbiology*, *8*, 464.

Farag, R. S., Abdel-Latif, M. S., Emam, S. S., & Tawfeek, L. S. (2014). Phytochemical screening and polyphenol constituents of pomegranate peels and leave juices. *Agric Soil Sci*, *1*(6), 86-93.

Fekkar, A., Meyer, I., Brossas, J. Y., Dannaoui, E., Palous, M., Uzunov, M., ... & Datry, A. (2013). Rapid emergence of echinocandin resistance during Candida kefyr fungemia treatment with caspofungin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *57*(5), 2380-2382.

Ferrazzano, G. F., Scioscia, E., Sateriale, D., Pastore, G., Colicchio, R., Pagliuca, C., ... & Pagliarulo, C. (2017). In vitro antibacterial activity of pomegranate juice and peel extracts on cariogenic bacteria. *BioMed research international*, *2017*.

Ferreira, A. V., Prado, C. G., Carvalho, R. R., Dias, K. S. T., & Dias, A. L. T. (2013). Candidaalbicans and Non-C. albicans Candida species: Comparison of biofilm production and metabolic activity in biofilms, and putative virulence properties of isolates from hospital environments and infections. *Mycopathologia*, 175(3-4), 265-272.

Filioti, J., Spiroglou, K., & Roilides, E. (2007). Invasive candidiasis in pediatric intensive care patients: epidemiology, risk factors, management, and outcome. *Intensive care medicine*, 33(7), 1272-1283.

Fonseca, G. G., Heinzle, E., Wittmann, C., & Gombert, A. K. (2008). The yeast Kluyveromyces marxianus and its biotechnological potential. *Applied microbiology and biotechnology*, *79*(3), 339-354.

Friedman, M. (2007). Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Molecular nutrition & food research*, *51*(1), 116-134.

Fromtling, R. A. (1988). Overview of medically important antifungal azole derivatives. *Clinical microbiology reviews*, *1*(2), 187-217.

Geiger, J., Wessels, D., Lockhart, S. R., & Soll, D. R. (2004). Release of a potent polymorphonuclear leukocyte chemoattractant is regulated by white-opaque switching in Candida albicans. Infection and Immunity, 72(2), 667-677.

Ghannoum, M. A., & Rice, L. B. (1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical microbiology reviews*, *12*(4), 501-517.

Ghorbani, A., Sadrzadeh, A., Habibi, E., Dadgar, K., Akbari, J., Moosazadeh, M., ... & Vaezi, A. (2018). Efficacy of Camellia sinensis extract against Candida species in patients with denture stomatitis. *Current medical mycology*, *4*(3), 15.

Gonçalves, B., Ferreira, C., Alves, C. T., Henriques, M., Azeredo, J., & Silva, S. (2016). Vulvovaginal candidiasis: epidemiology, microbiology and risk factors. *Critical reviews in microbiology*, *42*(6), 905-927.

Gow, N. A., Van De Veerdonk, F. L., Brown, A. J., & Netea, M. G. (2012). Candida albicans morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nature reviews microbiology*, *10*(2), 112-122.

Gray, K. C., Palacios, D. S., Dailey, I., Endo, M. M., Uno, B. E., Wilcock, B. C., & Burke, M. D. (2012). Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(7), 2234-2239.

Hajjeh, R. A., Sofair, A. N., Harrison, L. H., Lyon, G. M., Arthington-Skaggs, B. A., Mirza, S. A., ... & Warnock, D. W. (2004). Incidence of bloodstream infections due to Candida species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *Journal of clinical microbiology*, *42*(4), 1519-1527.

Hamill, R. J. (2013). Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. *Drugs*, *73*(9), 919-934.

Hamzavi, S. S., Amanati, A., Badiee, P., Kadivar, M. R., Jafarian, H., Ghasemi, F., ... & Baghani, A. N. (2019). Changing face of Candida colonization pattern in pediatric patients with hematological malignancy during repeated hospitalizations, results of a prospective observational study (2016–2017) in shiraz, Iran. *BMC infectious diseases*, *19*(1), 1-9.

Hartsel, S. C., Hatch, C., & Ayenew, W. (1993). How does amphotericin B work?: Studies on model membrane systems. *Journal of Liposome Research*, *3*(3), 377-408.

Haslam, E. (2007). Vegetable tannins–Lessons of a phytochemical lifetime . *Phytochemistry* , *68*(22-24), 2713-2721.

Hata, D.J.; Hall, L.; Fothergill, A.W.; Larone, D.H. and Wengenack, N.L.A. (2007). Multicenter evaluation of the New VITEK2 Advanced colorimetric yeast Identification card. J. Clin. Microbio., 45(4): 1087-1092

Hirasawa, M., & Takada, K. (2004). Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against Candida albicans. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *53*(2), 225-229.

Hmid, I., Elothmani, D., Hanine, H., Oukabli, A., & Mehinagic, E. (2017). Comparative study of phenolic compounds and their antioxidant attributes of eighteen pomegranate (Punica granatum L.) cultivars grown in Morocco. *Arabian Journal of Chemistry*, *10*, S2675-S2684.

Hube, B. (2004). From commensal to pathogen: stage-and tissue-specific gene expression of Candida albicans. Curr Opin Microbiol, 7, 336-41.

Inglis, D. O., Skrzypek, M. S., Arnaud, M. B., Binkley, J., Shah, P., Wymore, F., & Sherlock, G. (2013). Improved gene ontology annotation for biofilm formation, filamentous growth, and phenotypic switching in *Candida albicans*. *Eukaryotic cell*, 12(1), 101-108.

Inselmann, G., Inselmann, U., & Heidemann, H. T. (2002). Amphotericin B and liver function. *European journal of internal medicine*, *13*(5), 288-292.

Ito, C. Y. K., Martins, C. A. D. P., Loberto, J. C. S., Santos, S. S. F. D., & Jorge, A. O. C. (2004). In vitro antifungal susceptibility of Candida spp. isolates from patients with chronic periodontitis and from control patients. *Brazilian oral research*, *18*, 80-84.

Joshi, A. K., & Juyal, D. (2017). Traditional and ethnobotanical uses of Quercus leucotrichophora a. Camus (Quercus oblongata D. Don) in Kumaun and Garhwal regions of Uttarakhand, India: a review. *Int. J. Herb. Med*, *5*, 06-08.

Jung, D. S., Farmakiotis, D., Jiang, Y., Tarrand, J. J., & Kontoyiannis, D. P. (2015). Uncommon Candida species fungemia among cancer patients, Houston, Texas, USA. *Emerging Infectious Diseases*, *21*(11), 1942.

Junqueira, J. C., Vilela, S. F., Rossoni, R. D., Barbosa, J. O., Costa, A. C. B., Rasteiro, V., ... & Jorge, A. O. C. (2012) . Oral colonization by yeasts in HIV-positive patients in Brazil . *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 54, 17-24.

Kabir, M. A., & Ahmad, Z. (2013). Candida infections and their prevention. International Scholarly Research Notices, 2013.

Kanafani, Z. A., & Perfect, J. R. (2008). Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clinical infectious diseases*, *46*(1), 120-128.

Kaneria, M. J., Bapodara, M. B., & Chanda, S. V. (2012). Effect of extraction techniques and solvents on antioxidant activity of pomegranate (Punica granatum L.) leaf and stem. *Food Analytical Methods*, *5*(3), 396-404.

Karar, M. G. E., & Kuhnert, N. (2017). Herbal drugs from Sudan: Traditional uses and phytoconstituents. *Pharmacognosy reviews*, *11*(22), 83.

Karstrup, C. C., Aalbæk, B., Klitgaard, K., Jensen, T. K., Pedersen, H. G., & Agerholm, J. S. (2017). Colonization of the bovine uterus by Candida kefyr. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *59*(1), 1-6.

Khan, Z., Ahmad, S., Al-Obaid, K., Joseph, L., & Chandy, R. (2015). Candida kefyr as a cause of bloodstream infection and adjunctive role of biomarkers in its diagnosis. *Journal de mycologie medicale*, *25*(1), 71-75.

Kim, J., & Sudbery, P. (2011). Candida albicans, a major human fungal pathogen. *The Journal of Microbiology*, 49(2), 171-177.

Kumar, A., Zarychanski, R., Pisipati, A., Kumar, A., Kethireddy, S., & Bow, E. J. (2018). Fungicidal versus fungistatic therapy of invasive Candida infection in non-neutropenic adults: a meta-analysis. *Mycology*, *9*(2), 116-128.

Kurtzman, C., Fell, J. W., & Boekhout, T. (Eds.). (2011). *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier.

Kwamin, F., Nartey, N. O., Codjoe, F. S., & Newman, M. J. (2013). Distribution of Candida species among HIV-positive patients with oropharyngeal candidiasis in Accra, Ghana. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 7(01), 041-045.

Lamb, D. C., Kelly, D. E., Waterman, M. R., Stromstedt, M., Rozman, D., & Kelly, S. L. (1999). Characteristics of the heterologously expressed human lanosterol 14α-demethylase (other names: P45014DM, CYP51, P45051) and inhibition of the purified human and Candida albicans CYP51 with azole antifungal agents. *Yeast*, *15*(9), 755-763.

Laniado-Laborín, R., & Cabrales-Vargas, M. N. (2009). Amphotericin B: side effects and toxicity. *Revista iberoamericana de micología*, *26*(4), 223-227.

Lanternier, F., and Lortholary, O. (2008). Liposomal amphotericin B: what is its role in 2008?. *Clinical Microbiology and Infection*, 14:71-83.

Lee, S. C., Fung, C. P., Chen, H. Y., Li, C. T., Jwo, S. C., Hung, Y. B., ... & Lee, J. C. (2002). Candida peritonitis due to peptic ulcer perforation: incidence rate, risk factors, prognosis and susceptibility to fluconazole and amphotericin B. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, *44*(1), 23-27.

Lewis, L. E., Bain, J. M., Lowes, C., Gow, N. A., & Erwig, L. P. (2012). Candida albicans infection inhibits macrophage cell division and proliferation. *Fungal Genetics and Biology*, 49(9), 679-680.

Li, Y. Y., Chen, W. Y., Li, X., Li, H. B., Li, H. Q., Wang, L., ... & Yao, Y. G. (2013). Asymptomatic oral yeast carriage and antifungal susceptibility profile of HIV-infected patients in Kunming, Yunnan Province of China. *BMC infectious diseases*, 13(1), 1-9.

Ligozzi, M., Bernini, C., Bonora, M. G., De Fatima, M., Zuliani, J., & Fontana, R. (2002). Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci. *Journal of clinical microbiology*, *40*(5), 1681-1686.

Lim, C. Y., Rosli, R., Seow, H. F., & Chong, P. P. (2012). Candida and invasive candidiasis: back to basics. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 31(1), 21-31.

Lipperheide, V., Bikandi, J., García-Fernández, J. F., Quindós, G., & Pomon, J. (2002). Colony variation in Candida glabrata isolates from patients with vaginitis. *Revista iberoamericana de micologia*, *19*(3), 161-164.

Liu, M. B., Xu, S. R., He, Y., Deng, G. H., Sheng, H. F., Huang, X. M., ... & Zhou, H. W. (2013). Diverse vaginal microbiomes in reproductive-age women with vulvovaginal candidiasis. *PloS one*, 8(11), e79812.

Liu, X., Ma, Z., Zhang, J., & Yang, L. (2017). Antifungal compounds against Candida infections from traditional Chinese medicine. *BioMed Research International*, *2017*.

Lumbsch, H. T., & Huhndorf, S. M. (2007). Outline of ascomycota–2007. Myconet, 13, 1-58.

Lynch, D. P. (1994). Oral candidiasis: history, classification, and clinical presentation. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology*, 78(2), 189-193.

Magbool, F. A., Elnima, E. I., Shayoub, M. E., & Hussein, S. E. O. (2018). Preliminary phytochemical screening of Quercus infectoria galls. *World J Pharm Pharmaceu Sci*, *7*, 77-87.

Mahmoudabadi, A. Z., Zarrin, M., & Fard, M. B. (2013). Antifungal susceptibility of Candida species isolated from candiduria. *Jundishapur Journal of Microbiology*, *6*(1), 24.

Majid, A., Mohaddesse, M., Mahdi, D., Mahdi, S., Sanaz, S., & Kassaiyan, N. (2010). Overview on Echinophora platyloba, a synergistic anti-fungal agent candidate. *Journal of Yeast and Fungal research*, *1*(5), 88-94.

Maregesi, S. M., Pieters, L., Ngassapa, O. D., Apers, S., Vingerhoets, R., Cos, P., ... & Vlietinck, A. J. (2008). Screening of some Tanzanian medicinal plants from Bunda district for antibacterial, antifungal and antiviral activities. *Journal of ethnopharmacology*, *119*(1), 58-66.

Martinez-Rossi, N. M., Peres, N. T., & Rossi, A. (2008). Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. *Mycopathologia*, *166*(5), 369-383.

Mason, K. L., Erb Downward, J. R., Mason, K. D., Falkowski, N. R., Eaton, K. A., Kao, J. Y., ... & Huffnagle, G. B. (2012). Candida albicans and bacterial microbiota interactions in the cecum during recolonization following broad-spectrum antibiotic therapy. *Infection and immunity*, 80(10), 3371-3380.

Mathé, L., & Van Dijck, P. (2013). Recent insights into Candida albicans biofilm resistance mechanisms. *Current genetics*, 59(4), 251-264.

Mathur, A., Gopalakrishnan, D., Mehta, V., Rizwan, S. A., Shetiya, S. H., & Bagwe, S. (2018). Efficacy of green tea-based mouthwashes on dental plaque and gingival inflammation: a systematic review and meta-analysis. *Indian Journal of Dental Research*, *29*(2), 225.

McCarthy, M. W., Kontoyiannis, D. P., Cornely, O. A., Perfect, J. R., & Walsh, T. J. (2017). Novel agents and drug targets to meet the challenges of resistant fungi. *The Journal of infectious diseases*, *216*(suppl_3), S474-S483.

Mesa-Arango, A. C., Scorzoni, L., & Zaragoza, O. (2012). It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Frontiers in microbiology*, *3*, 286.

Meziti, H., Bouriche, H., Kada, S., Demirtas, I., Kizil, M., Senator, A., & Garrido, G. (2019). Phytochemical analysis, and antioxidant, anti-hemolytic and genoprotective effects of Quercus ilex L. and Pinus halepensis Mill. methanolic extracts. *J Pharm Pharmacogn Res*, *7*(4), 260-72.

Middha, S. K., Usha, T., & Pande, V. (2013). A review on antihyperglycemic and antihepatoprotective activity of eco-friendly Punica granatum peel waste. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2013*.

Mitscher, L. A., LEU, R. P., MS, B., & WU, W. N. (1972). Antimicrobial agents from higher plants. I. Introduction, rationale, and methodology.

Moen, M. D., Lyseng-Williamson, K. A., & Scott, L. J. (2009). Liposomal amphotericin B. *Drugs*, *69*(3), 361-392.

Momparler, R. L. (2013). Optimization of cytarabine (ARA-C) therapy for acute myeloid leukemia. *Experimental hematology & oncology*, *2*(1), 1-5.

Mondelli, A. L., Niéro-Melo, L., Bagagli, E., Camargo, C. H., Bruder-Nascimento, A., Sugizaki, M. F., ... & Villas Boas, P. J. F. (2012). Candida spp.: manual identification (reference method) and automated identification (Vitek system platform). *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, *18*(3), 335-339.

Morad , H. O., Wild, A. M., Wiehr, S., Davies, G., Maurer, A., Pichler, B. J., & Thornton, C. R. (2018). Pre-clinical imaging of invasive Candidiasis using ImmunoPET/MR. *Frontiers in microbiology*, 9, 1996.

Morello, J. A., Granato, P. A., & Mizer, H. E. (2004). *Laboratory manual and workbook in microbiology*. McGraw-Hill Science, Engineering & Mathematics.

Moris, D. V., Melhem, M. S. C., Martins, M. A., & Mendes, R. P. (2008). Oral Candida spp. colonization in human immunodeficiency virus-infected individuals. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 14, 224-257.

Morschhäuser, J. (2010). Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, *47*(2), 94-106.

Moshfeghy, Z., Asadi, K., Akbarzadeh, M., Zare, A., Poordast, T., Emamghoreishi, M., ... & Sayadi, M. (2018). Quercus brantii Lindl. vaginal douche versus clotrimazole on vaginal candidiasis: a randomized clinical trial. *Journal of pharmacopuncture*, *21*(3), 185.

Naglik, J. R., Challacombe, S. J., & Hube, B. (2003). Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiology and molecular biology reviews*, *67*(3), 400-428.

Naglik, J. R., Moyes, D., Makwana, J., Kanzaria, P., Tsichlaki, E., Weindl, G., ... & Hube, B. (2008). Quantitative expression of the Candida albicans secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiology (Reading, England)*, *154*(Pt 11), 3266.

Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of natural products*, *79*(3), 629-661.

Nguyen, M. V. H., Davis, M. R., Wittenberg, R., Mchardy, I., Baddley, J. W., Young, B. Y., ... & Thompson III, G. R. (2020). Posaconazole serum drug levels associated with pseudohyperaldosteronism. *Clinical Infectious Diseases*, *70*(12), 2593-2598.

Ning, Y., Ling, J., & Wu, C. D. (2015). Synergistic effects of tea catechin epigallocatechin gallate and antimycotics against oral Candida species. *Archives of oral biology*, *60*(10), 1565-1570.

Nobile, C. J., & Johnson, A. D. (2015). Candida albicans biofilms and human disease. *Annual review of microbiology*, 69, 71-92.

Nurat, A. A., Ola, B. G., Olushola, S. M., Mikhail, T. A., & Ayodeji, A. S. (2016). Molecular and phenotypic identification of Candida isolates from pregnant women in Ogbomoso, Southwestern Nigeria. *Int J Reprod Contracept Obstet Gynecol*, *5*(2), 317-22.

Odds, F. C. (1991). Sabouraud ('s) agar. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 29(6), 355-359.

Ortega, M., Marco, F., Soriano, A., Almela, M., Martínez, J. A., López, J., ... & Mensa, J. (2011). Candida species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. Journal of hospital infection, 77(2), 157-161.

Ortega, M., Marco, F., Soriano, A., Almela, M., Martínez, J. A., Pitart, C., & Mensa, J. (2010). Candida spp. bloodstream infection: influence of antifungal treatment on outcome. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(3), 562-568.

Panichayupakarananta, P., Issuriya, A., Sirikatitham, A., & Wang, W. (2010). Antioxidant assay-guided purification and LC determination of ellagic acid in pomegranate peel. *Journal of chromatographic science*, *48*(6), 456-459.

Papon, N., Courdavault, V., Clastre, M., & Bennett, R. J. (2013). Emerging and emerged pathogenic Candida species: beyond the Candida albicans paradigm. *PLoS pathogens*, *9*(9), e1003550.

Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D. R., Clancy, C. J., Marr, K. A., Ostrosky-Zeichner, L., ... & Sobel, J. D. (2016). Executive summary: clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases*, *62*(4), 409-417.

Park, H. C., Boyce, J., Shin, J., and Appel, B. (2005). Oligodendrocyte specification in zebrafish requires notch-regulated cyclin-dependent kinase inhibitor function. The Journal of Neuroscience: the offical journal of the Society for Neuroscience, 25(29), 6863-6844.

Paul, D., Biswas, K., & Sinha, S. N. (2015). Biological activities of Adenium obesum (Forssk.) Roem. & Schult.: a concise review. *Malaya Journal of Biosciences*, *2*(4), 214-221.

Pemán, J., Canton, E., & Espinel-Ingroff, A. (2009). Antifungal drug resistance mechanisms. *Expert review of anti-infective therapy*, *7*(4), 453-460.

Perfect, J. R. (2017). The antifungal pipeline: a reality check. *Nature reviews Drug discovery*, *16*(9), 603-616.

Perlroth, J., Choi, B., & Spellberg , B. (2007). Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Medical mycology*, 45(4), 321-346.

Pfaller, M. A. (2012). Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American journal of medicine*, *125*(1), S3-S13.

Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical microbiology reviews*, *20*(1), 133-163.

Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Messer, S. A., Boyken, L., Hollis, R. J., & Jones, R. N. (2004). In vitro susceptibilities of rare Candida bloodstream isolates to ravuconazole and three comparative antifungal agents. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, *48*(2), 101-105.

Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Turnidge, J. D., Castanheira, M., & Jones, R. N. (2019, March). Twenty years of the SENTRY antifungal surveillance program: results for Candida species from 1997–2016. In *Open forum infectious diseases* (Vol. 6, No. Supplement_1, pp. S79-S94). US: Oxford University Press.

Pfaller, M. A., Messer, S. A., Woosley, L. N., Jones, R. N., & Castanheira, M. (2013). Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic and temporal trends of antifungal resistance. *Journal of clinical microbiology*, *51*(8), 2571-2581.

Pirofski, L. A., & Casadevall, A. (2009). Rethinking T cell immunity in oropharyngeal candidiasis. *Journal of Experimental Medicine, 206*(2), 269-273.

Popović, B. M., Štajner, D., Ždero, R., Orlović, S., & Galić, Z. (2013). Antioxidant characterization of oak extracts combining spectrophotometric assays and chemometrics. *The Scientific World Journal*, *2013*.

Prabhakar, J., Senthilkumar, M., Priya, M. S., Mahalakshmi, K., Sehgal, P. K., & Sukumaran, V. G. (2010). Evaluation of antimicrobial efficacy of herbal alternatives (Triphala and green tea polyphenols), MTAD, and 5% sodium hypochlorite against Enterococcus faecalis biofilm formed on tooth substrate: an in vitro study. *Journal of endodontics*, *36*(1), 83-86.

Qu, Y., Fang, M., Gao, B., Amouzadeh, H. R., Li, N., Narayanan, P., ... & Vargas, H. M. (2013). Itraconazole decreases left ventricular contractility in isolated rabbit heart: mechanism of action. *Toxicology and applied pharmacology*, *268*(2), 113-122.

Rajendran, R., Robertson, D. P., Hodge, P. J., Lappin, D. F., & Ramage, G. (2010). Hydrolytic enzyme production is associated with Candida albicans biofilm formation from patients with type 1 diabetes. *Mycopathologia*, *170*(4), 229-235.

Raju S. B; and Rajappa S. (2011). Isolation and Identification of Candida from the Oral Cavity. ISRN. Dentistry., 7.

Raman, S. B., Nguyen, M. H., Cheng, S., Badrane, H., Iczkowski, K. A., Wegener, M., ... & Clancy, C. J. (2013). A competitive infection model of

hematogenously disseminated candidiasis in mice redefines the role of Candida albicans IRS4 in pathogenesis. Infection and immunity, 81(5), 1430-1438.

Reuter, C. W., Morgan, M. A., Bange, F. C., Gunzer, F., Eder, M., Hertenstein, B., & Ganser, A. (2005). Candida kefyr as an emerging pathogen causing nosocomial bloodstream infections in neutropenic leukemia patients. *Clinical infectious diseases*, *41*(9), 1365-1366.

Revankar, S. G., Kirkpatrick, W. R., McAtee, R. K., Fothergill, A. W., Redding, S. W., Rinaldi, M. G., & Patterson, T. F. (1998). Interpretation of trailing endpoints in antifungal susceptibility testing by the National Committee for Clinical Laboratory Standards method. *Journal of Clinical Microbiology*, *36*(1), 153-156.

Revie, N. M., Iyer, K. R., Robbins, N., & Cowen, L. E. (2018). Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. *Current opinion in microbiology*, *45*, 70-76.

Rex, J. H., Pfaller, M. A., Barry, A. L., Nelson, P. W., & Webb, C. D. (1995). Antifungal susceptibility testing of isolates from a randomized, multicenter trial of fluconazole versus amphotericin B as treatment of nonneutropenic patients with candidemia. NIAID Mycoses Study Group and the Candidemia Study Group. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *39*(1), 40-44.

Riera, M., Mogensen, E., d'Enfert, C., & Janbon, G. (2012) . New regulators of biofilm development in Candida glabrata. *Research in microbiology*, 163(4), 297-307.

Risan, M. H. (2016). Molecular identification of yeast Candida glabrata from candidemia patients in Iraq. *Iraqi Journal of Science*, *57*(2A), 808-813.

Rodrigues, E. N. L., Mendonça, M. D. S., & Costa-Schmidt, L. E. (2014). Spider diversity responds strongly to edge effects but weakly to vegetation structure in riparian forests of Southern Brazil . *Arthropod-Plant Interactions*, *8*(2), 123-133.

Romani, N., Holzmann, S., Tripp, C. H., Koch, F., and Stoitzner, P. (2003). Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. APMIS, 111, 725-740.

Rowayshed, G., Salama, A., Abul-Fadl, M., Akila-Hamza, S., & Emad, A. M. (2013). Nutritional and chemical evaluation for pomegranate (Punica granatum L.) fruit peel and seeds powders by products. *Middle East Journal of Applied Sciences*, *3*(4), 169-179.

Salazar, S. B., Simões, R. S., Pedro, N. A., Pinheiro, M. J., Carvalho, M. F. N., & Mira, N. P. (2020). An overview on conventional and non-conventional therapeutic approaches for the treatment of candidiasis and underlying resistance mechanisms in clinical strains. *Journal of Fungi*, 6(1), 23.

Salih, K. A. (2016). Synergistic effects of plant extracts and antifungal drugs on C. albicans. *J Dev Drugs*, *5*(3).

Sangeetha, J., & Vijayalakshmi, K. (2012). Physicochemical Evaluation and Chromatographic Fingerprint Profile of the Rind of Ganesh Variety of Punica granatum Linn. *IJPBS 2012*, *3*, 329-337.

Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., & Giannini, M. M. (2013). Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm

formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of medical microbiology*, *62*(1), 10-24.

Sati, S. C., Sati, N., Sati, O. P., Biswas, D., & Chauhan, B. S. (2012). Analysis and antimicrobial activity of volatile constituents from Quercus leucotrichophora (Fagaceae) bark. *Natural product research*, *26*(9), 869-872.

Saxena, G., Farmer, S. W., Hancock, R. E. W., & Towers, G. H. N. (1996). Chlorochimaphilin: a new antibiotic from Moneses uniflora. *Journal of natural products*, *59*(1), 62-65.

Seneviratne, C. J., Jin, L., & Samaranayake, L. P. (2008). Biofilm lifestyle of Candida: a mini review. *Oral diseases*, *14*(7), 582-590.

Sh, D. V. B., Sonkhla, K., Joshi, R., & Gupta, M. (2017). Quantification of free and bound phenolics in Bio-Waste pomegranate peel and formulation of punicalagin rich riceextruded snacks. *International Journal of Food and Nutritional Science*, *4*(2), 98-104.

Shao, L. C., Sheng, C. Q., & Zhang, W. N. (2007). Recent advances in the study of antifungal lead compounds with new chemical scaffolds. Yao xue xue bao= Acta pharmaceutica Sinica, 42(11), 1129-1136.

Shimizu, K., Osada, M., Takemoto, K., Yamamoto, Y., Asai, T., & Oku, N. (2010). Temperature-dependent transfer of amphotericin B from liposomal membrane of AmBisome to fungal cell membrane. *Journal of Controlled Release*, *141*(2), 208-215.

Siddiqui, M. W., Sharangi, A. B., Singh, J. P., Thakur, P. K., Ayala-Zavala, J. F., Singh, A., & Dhua, R. S. (2016). Antimicrobial properties of teas and

their extracts in vitro. *Critical reviews in food science and nutrition*, *56*(9), 1428-1439.

Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. (2012). Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS microbiology reviews*, *36*(2), 288-305.

Singh S., Kumar,A. and Kumar, A.,(2013). Species identification , antifungal susceptibilty testing and genetic variability among Candida species isolated from clinical samples. Journal of drug discovery and therapeutic . 1(3):01-11 .

Singh, D. K., Tóth, R., & Gácser, A. (2020). Mechanisms of pathogenic Candida species to evade the host complement attack. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *10*, 94.

Singh, R. P., Chidambara Murthy, K. N., & Jayaprakasha, G. K. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate (Punica granatum) peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of agricultural and food chemistry*, *50*(1), 81-86.

Soll, D. R. (2002). Candida commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta tropica*, *81*(2), 101-110.

Sood, R.(1994). Medical Laboratory Technology: methods & interpretation. 4th ed. Jaype Brothers Medical publishers.

Sorrentino, E., Succi, M., Tipaldi, L., Pannella, G., Maiuro, L., Sturchio, M., ... & Tremonte, P. (2018). Antimicrobial activity of gallic acid against food-related Pseudomonas strains and its use as biocontrol tool to improve the shelf

life of fresh black truffles. *International journal of food microbiology*, *266*, 183-189.

Staab, J. F., Neofytos, D., Rhee, P., Jiménez-Ortigosa, C., Zhang, S. X., Perlin, D. S., & Marr, K. A. (2014). Target enzyme mutations confer differential echinocandin susceptibilities in Candida kefyr. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *58*(9), 5421-5427.

Stone, N. R., Bicanic, T., Salim, R., & Hope, W. (2016). Liposomal amphotericin B (AmBisome®): a review of the pharmacokinetics, pharmacodynamics, clinical experience and future directions. *Drugs*, *76*(4), 485-500.

Sultan, W. A., & Zghair, F. S. (2020). Susceptibility of clinical Candida albicans isolates to oak extract that resistance antifungal compounds. *Eur. J. Mol. Clin. Med*, *7*, 5130-5137.

Svahn, K. S., Chryssanthou, E., Olsen, B., Bohlin, L., & Göransson, U. (2015). Penicillium nalgiovense Laxa isolated from Antarctica is a new source of the antifungal metabolite amphotericin B. *Fungal biology and biotechnology*, *2*(1), 1-8.

Svetaz, L., Zuljan, F., Derita, M., Petenatti, E., Tamayo, G., Cáceres, A., ... & Gupta, M. (2010). Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. *Journal of ethnopharmacology*, *127*(1), 137-158.

Tayel, A. A., Wael, F., Abdel-Monem, O. A., El-Sabbagh, S. M., Alsohim, A. S., & El-Refai, E. M. (2013). Production of anticandidal cotton textiles

treated with oak gall extract. *Revista Argentina de microbiologia*, *45*(4), 271-276.

Terças, A. L., Marques, S. G., Moffa, E. B., Alves, M. B., de Azevedo, C. M., Siqueira, W. L., & Monteiro, C. A. (2017) . Antifungal drug susceptibility of Candida species isolated from HIV-positive patients recruited at a public hospital in São Luís , Maranhão , Brazil . *Frontiers in microbiology* , 8 , 298.

Thompson III, G. R., Chang, D., Wittenberg, R. R., McHardy, I., & Semrad, A. (2017). In vivo 11β-hydroxysteroid dehydrogenase inhibition in posaconazole-induced hypertension and hypokalemia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *61*(8), e00760-17.

Thompson III, G. R., Krois, C. R., Affolter, V. K., Everett, A. D., Varjonen, E. K., Sharon, V. R., ... & White, S. D. (2019). Examination of fluconazole-induced alopecia in an animal model and human cohort. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *63*(2), e01384-18.

Timmermans, B., De Las Peñas, A., Castaño, I., & Van Dijck, P. (2018). Adhesins in Candida glabrata. *Journal of Fungi*, *4*(2), 60.

Torrado, J. J., Espada, R., Ballesteros, M. P., & Torrado-Santiago, S. (2008). Amphotericin B formulations and drug targeting. *Journal of pharmaceutical sciences*, *97*(7), 2405-2425.

Tsai, P. W., Chen, Y. T., Hsu, P. C., & Lan, C. Y. (2013). Study of Candida albicans and its interactions with the host: a mini review. *BioMedicine*, 3(1), 51-64.

Vallabhaneni, S., Mody, R. K., Walker, T., & Chiller, T. (2016). The global burden of fungal diseases. *Infectious Disease Clinics*, 30(1), 1-11.

Van Daele, R., Spriet, I., Wauters, J., Maertens, J., Mercier, T., Van Hecke, S., & Brüggemann, R. (2019). Antifungal drugs: what brings the future?. *Medical mycology*, *57*(Supplement_3), S328-S343.

van Vuuren, S., & Viljoen, A. (2011). Plant-based antimicrobial studies–methods and approaches to study the interaction between natural products. *Planta medica*, *77*(11), 1168-1182.

Vázquez-González, D., Perusquía-Ortiz, A. M., Hundeiker, M., & Bonifaz, A. (2013). Opportunistic yeast infections: candidiasis, cryptococcosis, trichosporonosis and geotrichosis. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 11(5), 381-394.

Vermes, A., Guchelaar, H. J., & Dankert, J. (2000). Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *46*(2), 171-179.

Violante, I. M. P., Hamerski, L., Garcez, W. S., Batista, A. L., Chang, M. R., Pott, V. J., & Garcez, F. R. (2012). Antimicrobial activity of some medicinal plants from the cerrado of the central-western region of Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, *43*(4), 1302-1308.

Volmer, A. A., Szpilman, A. M., & Carreira, E. M. (2010). Synthesis and biological evaluation of amphotericin B derivatives. *Natural product reports*, *27*(9), 1329-1349.

Wang, E., Farmakiotis, D., Yang, D., McCue, D. A., Kantarjian, H. M., Kontoyiannis, D. P., & Mathisen, M. S. (2015). The ever-evolving landscape of candidaemia in patients with acute leukaemia: non-susceptibility to caspofungin and multidrug resistance are associated with increased mortality. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *70*(8), 2362-2368.

Wang, Y., Bandara, H. M. H. N., Mikkelsen, D., & Samaranayake, L. P. (2017). Effects of tea extracts on the colonization behaviour of Candida species: attachment inhibition and biofilm enhancement. *Journal of medical microbiology*, *66*(8), 1244-1252.

Welter, S., Bracho-Nuñez, A., Mir, C., Zimmer, I., Kesselmeier, J., Lumaret, R., ... & Staudt, M. (2012). The diversification of terpene emissions in Mediterranean oaks: lessons from a study of Quercus suber, Quercus canariensis and its hybrid Quercus afares. *Tree Physiology*, *32*(9), 1082-1091.

White, T. C., Marr, K. A., & Bowden, R. A. (1998). Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clinical microbiology reviews*, *11*(2), 382-402.

Willacy, H., & Jackson, C. (2011). Vaginal and vulval candidiasis. Online at Patient. co. uk/doctor/Vaginal-and-Vulval-Candidiasis. htm.

Wu, S., & Tian, L. (2017). Diverse phytochemicals and bioactivities in the ancient fruit and modern functional food pomegranate (Punica granatum). *Molecules*, *22*(10), 1606.

Yang, Y. L. (2003). Virulence factors of Candida species. *Journal of Microbiology Immunology and Infection*, *36*(4), 223-228.

Yao, B., Ji, H., Cao, Y., Zhou, Y., Zhu, J., Lü, J., ... & Tang, H. (2007). Synthesis and antifungal activities of novel 2-aminotetralin derivatives. *Journal of medicinal chemistry*, *50*(22), 5293-5300.

Yehia, H. M., Elkhadragy, M. F., & Moneim, A. E. A. (2011). Antimicrobial activity of pomegranate rind peel extracts. *African Journal of Microbiology Research*, *5*(22), 3664-3668.

Yue, Q., Chen, L., Zhang, X., Li, K., Sun, J., Liu, X., ... & Bills, G. F. (2015). Evolution of chemical diversity in echinocandin lipopeptide antifungal metabolites. *Eukaryotic Cell*, *14*(7), 698-718.

Zeng, X., Zhang, Y., Zhang, T., Xue, Y., Xu, H., & An, R. (2018). Risk factors of vulvovaginal candidiasis among women of reproductive age in Xi'an: a cross-sectional study. *BioMed research international*, 2018.

Zepelin, M. B. V., Kunz, L., Rüchel, R., Reichard, U., Weig, M., & Groß, U. (2007). Epidemiology and antifungal susceptibilities of Candida spp. to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *60*(2), 424-428.

Zghair, Z. R. (2018) Comparative Pathological Study of the Effect Crude Extracts of Oak Galls (Quercus infectoria) and Pomegranate Peels (Punica granatum. L) On Some Pathogenic Bacteria In vitro and In vivo.

Zuza-Alves, D. L., Silva-Rocha, W. P., & Chaves, G. M. (2017). An update on Candida tropicalis based on basic and clinical approaches. *Frontiers in microbiology*, *8*, 1927.

AL-KAFEEL HOSPETAL
Microbiology Chart Report

Printed Feb 25, 2021 17:11 CST

bioMérieux Customer:

Patient Name: 24, -
Location:
Lab ID: N24

Patient ID: N24
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Candida glabrata

Collected:

Source: SWAB

Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:**	17.82 hours	**Status:** Final
Selected Organism	95% Probability **Bionumber:**	**Candida glabrata** 4010104020201111	
ID Analysis Messages	See product information for additional information.		

Susceptibility Information	Analysis Time: 14.88 hours			Status: Final	
Antimicrobial	**MIC**	**Interpretation**	**Antimicrobial**	**MIC**	**Interpretation**
Fluconazole			Micafungin	<= 0.06	S
Voriconazole	0.5	S	Amphotericin B	2	I
Caspofungin	0.25	I	Flucytosine	<= 1	S

+= Deduced drug *= AES modified **= User modified

AES Findings	
Confidence:	Analysis not performed

AL-KAFEEL HOSPETAL

bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed Feb 24, 2021 20:20 CST

Patient Name: 21, -
Location:
Lab ID: N21

Patient ID: N21
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Candida glabrata

Source: URINE

Collected:

Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:** 17.90 hours	**Status:** Final
Selected Organism	99% Probability **Candida glabrata** **Bionumber:** 4000104000200110	
ID Analysis Messages	See product information for additional information.	

Susceptibility Information	**Analysis Time:** 12.03 hours			**Status:** Final	
Antimicrobial	**MIC**	**Interpretation**	**Antimicrobial**	**MIC**	**Interpretation**
Fluconazole			Micafungin	<= 0.06	S
Voriconazole	<= 0.12	S	Amphotericin B	1	S
Caspofungin	<= 0.12	S	Flucytosine	<= 1	S

+= Deduced drug *= AES modified **= User modified

AES Findings	
Confidence:	Analysis not performed

AL-KAFEEL HOSPETAL

bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed Feb 24, 2021 20:22 CST

Patient Name: 23, -
Location:
Lab ID: N23

Patient ID: N23
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Candida kefyr

Source: URINE

Collected:

Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:**	17.97 hours	**Status:**	Final
Selected Organism	99% Probability	**Candida kefyr**		
	Bionumber:	6013305061015310		
ID Analysis Messages				

Susceptibility Information	**Analysis Time:**	11.37 hours		**Status:**	Final
Antimicrobial	**MIC**	**Interpretation**	**Antimicrobial**	**MIC**	**Interpretation**
Fluconazole			Micafungin		
Voriconazole	<= 0.12	S	Amphotericin B	8	R
Caspofungin			Flucytosine	<= 1	S

+= Deduced drug *= AES modified **= User modified

AES Findings	
Confidence:	Analysis not performed

AL-KAFEEL HOSPETAL

bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed Feb 24, 2021 20:20 CST

Patient Name: 22, -
Location:
Lab ID: N22

Patient ID: N22
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Candida tropicalis

Source: URINE

Collected:

Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:**	17.98 hours	**Status:**	Final
Selected Organism	99% Probability **Bionumber:**	**Candida tropicalis** 6102544245323771		
ID Analysis Messages				

Susceptibility Information	**Analysis Time:**	11.38 hours		**Status:**	Final
Antimicrobial	**MIC**	**Interpretation**	**Antimicrobial**	**MIC**	**Interpretation**
Fluconazole	<= 0.5	S	Micafungin	<= 0.06	S
Voriconazole	<= 0.12	S	Amphotericin B	0.5	S
Caspofungin	<= 0.12	S	Flucytosine	<= 1	S

+= Deduced drug *= AES modified **= User modified

AES Findings	
Confidence:	Analysis not performed

AL-KAFEEL HOSPETAL

bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed Feb 25, 2021 17:09 CST

Patient Name: 29, -
Location:
Lab ID: N29

Patient ID: N29
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Candida albicans

Source: SWAB

Collected:

Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:**	17.77 hours	**Status:**	Final
Selected Organism	86% Probability **Bionumber:**	**Candida albicans** 4102106024325371		
ID Analysis Messages				

Susceptibility Information	**Analysis Time:**	12.38 hours		**Status:**	Final
Antimicrobial	**MIC**	**Interpretation**	**Antimicrobial**	**MIC**	**Interpretation**
Fluconazole	8	R	Micafungin	<= 0.06	S
Voriconazole	<= 0.12	S	Amphotericin B	0.5	S
Caspofungin	<= 0.12	S	Flucytosine	<= 1	S

+= Deduced drug *= AES modified **= User modified

AES Findings	
Confidence:	Analysis not performed

AL-KAFEEL HOSPETAL
Microbiology Chart Report

Printed Feb 21, 2021 18:17 CST

bioMérieux Customer:

Patient Name: 10, -
Location:
Lab ID: N10

Patient ID: N10
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Candida albicans

Source: SWAB

Collected:

Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:**	17.80 hours	**Status:**	Final
Selected Organism	99% Probability	**Candida albicans**		
	Bionumber:	4102544065327771		
ID Analysis Messages				

Susceptibility Information	**Analysis Time:**	11.95 hours		**Status:**	Final
Antimicrobial	**MIC**	**Interpretation**	**Antimicrobial**	**MIC**	**Interpretation**
Fluconazole	<= 0.5	S	Micafungin	<= 0.06	S
Voriconazole	<= 0.12	S	Amphotericin B	1	S
Caspofungin	<= 0.12	S	Flucytosine	<= 1	S

+= Deduced drug *= AES modified **= User modified

AES Findings	
Confidence:	Analysis not performed

AL-KAFEEL HOSPETAL
Microbiology Chart Report

Printed Feb 22, 2021 20:00 CST

bioMérieux Customer:

Patient Name: 15, -
Location:
Lab ID: N15

Patient ID: N15
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Candida albicans

Source:

Collected:

Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:**	17.93 hours	**Status:**	Final
Selected Organism	99% Probability **Bionumber:**	**Candida albicans** 4102546065327771		
ID Analysis Messages				

Susceptibility Information	**Analysis Time:**	10.33 hours		**Status:**	Final
Antimicrobial	**MIC**	**Interpretation**	**Antimicrobial**	**MIC**	**Interpretation**
Fluconazole	8	R	Micafungin	>= 8	R
Voriconazole	4	R	Amphotericin B	>= 16	R
Caspofungin	>= 8	R	Flucytosine	>= 64	R

+= Deduced drug *= AES modified **= User modified

AES Findings	
Confidence:	Analysis not performed

Summary

Due to frequent infections with fungi and other microorganisms, it has been observed that in recent years there has been an increase in interest in medicinal plants and herbs by using them as main sources for the production of medicinal drugs or as a source of active substances that are included in the composition of medicine. They are also used as a raw material for the production of some chemical compounds. Many studies have shown that plant extracts have an effective effect in treating many different microbial infections, including fungal infections such as candida and others, and they have given good results.

Candida is one of the causes of infections of the urinary system and the reproductive system of women, but the excessive use of antifungals led to the emergence of drug resistance to these antifungals. Therefore, it was appropriate to search for antifungals from natural sources for several reasons: their cheapness, availability, lack of side effects, and suitability for use.

The current study included the collection of 75 samples from different clinical cases, 50 samples of vaginal swabs and 25 urine samples for women in the holy city of Karbala who suffer from vaginal infections and urinary tract infections.

The results showed that the percentage of fungal infection in vaginal swabs samples was 60%, and the non-fungal infection (bacterial infection) was 40%. In urine samples, the fungal infection rate was 44%, while the non-fungal infection was 56%.

The results in the current study recorded that Candida albicans reached the highest frequency of *Candida glabrata* , *Candida tropicalis* and *Candida kefyr* in urine samples and vaginal samples, with 26 isolates out of 41 isolates, and a percentage of 63.4%.

The results showed that there were isolates of C. albicans that were resistant to antifungals, there were 7 isolates resistant to fluconazole antifungal and one isolate was resistant to all antifungals.

The results of the current study showed that the use of different concentrations of oak plant (25, 50, 75, 100) mg / ml gave a good inhibitory effect, and the highest inhibitory effect of oak plant was at a concentration of 100 mg / ml on all studied yeasts, as the rate of inhibition was 6.66 mm on *C. albicans*, while the same concentration showed the highest inhibition rate of 7.00 mm on *C. glabrata* and lower than it on *C. tropicalis* with an inhibition rate of 5.33 mm, while the lowest inhibition rate was 4.33 mm on *C. kefyr*.

The results showed that the use of different concentrations of pomegranate peel plant (25, 50, 75, 100) mg / ml, but at a concentration of 100 mg / ml gave a very high and higher inhibitory activity than oak, the inhibition rate was 9.67 mm on *C. albicans* yeast While the same concentration showed the highest inhibition rate of 13.67 mm on *C. glabrata* and lower than it on *C. tropicalis* with an inhibition rate of 8.67 mm, while the lowest inhibition rate was 6.33 mm on *C.kefyr*.

When mixing oak extract with pomegranate peel extract, it gave a higher inhibitory activity than oak alone and less than pomegranate alone for all concentrations used on *C. albicans* yeast resistant to antifungals. The highest inhibition rate was 8.66 mm at a concentration of 100 mg/ml.

The results also showed that there is a clear synergy between the extract of pomegranate peel and the antifungal amphotericin B. When the extract was mixed at a concentration of 100 mg / ml with the antifungal at a concentration of 0.001 µg / ml , the inhibition rate was 18.33 mm on the isolate of *C. albicans* yeast resistant to anti-fungal, and this shows the high synergy between Pomegranate peel extract and the antifungal amphotericin B.

As for green tea leaf extract, it did not give any significant activity at a concentration of 100 mg / ml, as well as the rest of the concentrations and on all isolated yeasts.

Ministry of Higher Education
& Scientific Research
University of Kerbala / College of Science
Department of Biology

Effect of some alcoholic plant extracts on *Candida* spp. isolated from the genitourinary system of women in Kerbala city

A thesis

Submitted to the council of the

College of Science – University of Kerbala

In partial of fulfillment of requirements for degree of Master of Science in Biology

By

Nareeman Hameed Turki

Supervised by

Assist. Prof. Dr. Zuhair Hameed Abboud

Prof. Dr. Mohanad Mohsen Ahmed

2021 AD **1443 AH**