

مطالعه ترکیب شیمیایی اسانس گیاه زنیان (*Trachyspermum ammi*) و اثر مهاري آن بر جدایه‌های دهانی کاندیدا آلبیکس مقاوم به آزول در بیماران مبتلا به ایدز

ایرج اشرفی تمای¹، تقی زهرایی صالحی²، علیرضا خسروی^{3*}، عقیل شریف‌زاده⁴، اسد بالال⁵

1- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

2- استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

3- استاد، مرکز قارچ‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

4- دستیار تخصصی، مرکز قارچ‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

5- کارشناس مرکز قارچ‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

*آدرس مکاتبه: تهران، خیابان آزادی، خیابان دکتر قریب، دانشکده دامپزشکی تهران، مرکز قارچ‌شناسی

تلفن و نمابر: 61117099 (021)

پست الکترونیک: akhosravi110@yahoo.com

تاریخ دریافت: 92/1/24

تاریخ تصویب: 92/3/21

چکیده

مقدمه: کاندیدیازیس دهانی با عامل کاندیدا آلبیکس از شایع‌ترین عفونت‌ها در بیماران با ضعف سیستم ایمنی می‌باشد. تشخیص سریع و دقیق این عامل فرصت‌طلب، در درمان و بقای بیماران اهمیت فراوانی دارد. هدف: در این مطالعه مقاومت سویه‌های کاندیدا آلبیکس جدا شده نسبت به داروهای آزولی و اثر اسانس زنیان بر این جدایه‌ها ارزیابی شد.

روش بررسی: از 70 بیمار HIV⁺ نمونه‌گیری با سواب از ناحیه دهانی صورت گرفت و شناسایی قطعی کاندیدا آلبیکس با روش‌های مورفولوژی، فنوتیپی و مولکولی انجام پذیرفت. حساسیت دارویی ایزوله‌ها به فلوکونازول، کتوکونازول و کلوتریمازول به روش انتشار دیسک و همچنین اثر اسانس زنیان بر روی ایزوله‌ها به دو روش انتشار دیسک و میکرودايلوشن براث مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج: از بین روش‌های شناسایی، روش مولکولی شناسایی سریع‌تر و صحیح‌تری را نسبت به روش‌های دیگر فراهم نمود. میزان مقاومت در فلوکونازول 32 درصد، کتوکونازول 28 درصد، کلوتریمازول 14 درصد مشاهده شد. در مورد اسانس زنیان، میزان 30 میکرولیتر این اسانس، به طور کامل از رشد کاندیدا آلبیکس در پلیت جلوگیری نمود. کمترین غلظت بازدارندگی اسانس (MIC) به روش میکرودايلوشن براث در 72 درصد جدایه‌ها 500 ppm و در 28 درصد دیگر 750 ppm و کمترین غلظت کشندگی (MFC) هم در 70 درصد ایزوله‌ها 750 ppm و مابقی 1000 ppm مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: بر این اساس به نظر می‌رسد استفاده از این گیاه بومی و اسانس آن به عنوان یک عامل ضد قارچی می‌تواند در درمان افراد مبتلا به کاندیدیازیس مخاطی در کنار داروهای دیگر، استفاده شود.

کل‌واژگان: آزول‌ها، اسانس زنیان، کاندیدا آلبیکس

مقدمه

کاندیدا آلبیکنس یک مخمر طبیعی در انسان و حیوانات خونگرم می‌باشد که بسته به شرایط میزبان عفونت‌هایی را می‌تواند ایجاد نماید [1]. از شایع‌ترین و مهم‌ترین این عفونت‌ها می‌توان کاندیدیازیس پوستی و مخاطی را نام برد که به صورت اولیه یا ثانویه و به شکل حاد یا مزمن می‌تواند دهان، ناخن و دستگاه گوارش را درگیر نماید و یا به صورت سیستمیک همراه با مننژیت، آندوکاردیت و سپتی سمی بروز کند [2]. از فاکتورهای مستعدکننده این عفونت می‌توان به اختلال سیستم ایمنی مانند: ایدز، شیمی درمانی، آنتی‌بیوتیک تراپی‌های پردامنه، سرطان‌ها، پیوند مغز استخوان و... اشاره کرد که باعث تهاجم این مخمر به بافت‌های عمقی می‌شوند. شناسایی سریع و دقیق کاندیدا آلبیکنس به عنوان یک عامل فرصت‌طلب بسیار حائز اهمیت است و پیدا کردن منابع عفونت و درک راه‌های انتقال بیماری، به ویژه در عفونت‌های بیمارستانی مستلزم شناسایی گونه‌هاست [3]. با توجه به اینکه در روش‌های شناسایی قدیمی مانند روش‌های فنوتیپی، بیوشیمیایی و مورفولوژی، عواملی همچون وقت‌گیر بودن آزمایش‌ها و احتمال تشخیص اشتباه در شناسایی وجود دارد، استفاده از روش‌های سریع و دقیق مولکولی در جهت تشخیص و کنترل بیماری و مطالعات اپیدمیولوژیک، این امکان را فراهم می‌سازند [4]. کاندیدیازیس دهانی از عفونت‌های شایع در افراد HIV⁺ بخصوص در مراحل قبل از درمان و مراحل پیشرفته می‌باشد. با وجود درمان دارویی ضد ویروسی HIV (HAART) و همچنین داروهای ضدقارچی، خصوصاً خانواده مهم آزول‌ها، کاهش عفونت‌های فرصت‌طلب همانند کاندیدیازیس با عامل کاندیدا آلبیکنس میسر می‌باشد اما امروزه گزارش‌های زیادی مبنی بر شکست در درمان بیماران مبتلا به کاندیدیازیس ارائه شده است که این امر باعث عدم پاسخ به درمان و در بیشتر موارد عود مجدد بیماری می‌شود [۵،۶،۷]. به علاوه مصرف طولانی‌مدت داروهای ضدقارچی در بیماران و عوارض ناشی از این داروها، باعث شده بیماران دوره‌های درمانی را به طور کامل سپری نکنند. مطالعات اپیدمیولوژیک

نشان داده است که اغلب عفونت‌های مهم قارچی توسط گونه‌های مقاوم به داروهای ضدقارچی ایجاد می‌شود. این موضوع بخصوص در مورد کاندیدا آلبیکنس و مقاومت آنها نسبت به داروی فلوکونازول مورد تأیید قرار گرفته است. به همین دلیل در سال‌های اخیر توجه محققین به سمت یافتن ترکیبات طبیعی و گیاهی با خواص مهارکنندگی رشد قارچ‌ها معطوف شده است و انواع مختلفی از گیاهان و عصاره‌ها و اسانس‌های آنها با موفقیت در مهار رشد قارچ‌ها در شرایط آزمایشگاهی به کار گرفته شده است [8]. این رویکرد شگفت‌انگیز جهانی به طب گیاهی، بسیار پیچیده است و شامل عوامل متفاوتی است که در گستره‌های مختلفی می‌توان به آن نگریست. شاید بی‌خطر بودن نسبی آن، در دسترس بودن و وفور داروهای گیاهی در کنار کنترل مسیر درمان و همخوانی با فلسفه کل‌نگر که تأکید بر روی فرآورده‌های طبیعی دارد از عوامل مهم باشد [9]. یکی از این گیاهان که دارای اثر دارویی خصوصاً اثر ضد میکروبی را داراست گیاه زنیان می‌باشد. از علل مهم انتخاب این گیاه در این مطالعه، فراوانی این گیاه با توجه به بومی بودن آن و مطالعات اندکی است که بر روی اثرات ضد قارچی آن صورت گرفته است. از طرفی اشاره به خواص ضد میکروبی آن در کتب قدیمی (الاعراض نوشته سید اسماعیل جرجانی) و همچنین دیگر خواص دارویی آن می‌باشد. نام علمی این گیاه *Trachyspermum Ammi* از تیره جعفری (*Umbelliferae*) بوده و در نقاط مختلف دنیا به نام‌های متفاوتی خوانده می‌شود. گیاهی است علفی، یکساله، بدون کرک و به ارتفاع 30 الی 90 سانتی‌متر که به حالت خودرو در نواحی شرقی هند، ایران و مصر می‌روید. میوه‌اش کوچک، بیضی و به رنگ زرد و دارای بویی شبیه به بوی تیمول می‌باشد که بخش دارویی این گیاه را تشکیل می‌دهد [۱۰، ۱۱]. زنیان از نظر طبیعت مانند زیره‌ها گرم و خشک است و از نظر خواص ضد اسپاسم، ضد نفخ معده، ضد ترشی معده، نیروبخش، مقوی قوای جنسی، بالا برنده فشار خون، محرک و بادشکن است. برای رفع بیماری‌های معده و کبد و ناراحتی گلو، سرفه و همچنین رماتیسم تجویز می‌شود. منبع غنی از

45 درجه سانتی‌گراد، تست جذب قندی با کیت Rap ID yeast plus و در نهایت جهت تشخیص قطعی از روش مولکولی PCR با پرایمرهای اختصاصی کاندیدا آلیکنس استفاده شد.

استخراج DNA

50 میکرولیتر از بافر STEN: (pH: 7.6 Tris-HCl) همراه چند کلنی از کاندیدا آلیکنس در یک ویال 1/5 میلی‌لیتری ریخته و ورتکس کرده تا به شکل یکنواخت در آمد سپس به مقدار یک سوم حجم بالا Glass Bead استریل و مقدار 20 میکرولیتر بافر TE (pH: 7.6): (Tris base) 10mM, EDTA 1mM, Hcl 0.1N و 60 میکرولیتر هم فنل کلروفرم (به نسبت یک به یک) اضافه کرده و یک دقیقه ورتکس شد. نمونه‌ها در 13000 rpm به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ شده و فاز فوقانی به یک ویال جدید منتقل شد. به اندازه 0/1 حجم نمونه، استات سدیم 3 مولار با pH: 5.2 و همچنین 2/5 برابر حجم اتانول مطلق افزوده شد و پس از چند بار سروته شدن ویال‌ها، به مدت 30 دقیقه در دمای منفی 20 درجه قرار گرفت. نمونه‌ها در 13000 rpm به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی را دور ریخته و به رسوب ته میکروتیوب 50 میکرولیتر اتانول 70 درصد افزوده شد. ویال‌ها بدون تکان دادن مجدداً در 13000 rpm به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی را دور ریخته و ویال‌ها 20 تا 30 دقیقه در محیط اتاق قرار داده شد تا الکل کاملاً تبخیر شود. 50 میکرولیتر بافر TE (pH: 8.3) به ویال اضافه کرده و یک میکرولیتر هم RNase (1 mg/ml) افزوده و نیم ساعت در دمای 37 درجه داده شد. DNA به دست آمده جهت استفاده در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [15].

روش PCR

جفت پرایمرهای اولیگونوکلوئیدی اختصاصی کاندیدا آلیکنس

5'-TTTATCAACTTGTCACACCAGA-3',
forward, CALB1, L47111)

تیمول است که نقش ضد عفونی‌کنندگی دارد [12]. اسانس میوه این گیاه آجوان (Ajowan) نام دارد که قدرت کشندگی و ضد میکروبی آن به خاطر ترکیباتی همچون تیمول (Thymol)، سایمن (Cymene)، بتا پینن (β - Pinene)، گاما ترپینن (γ - Trepinene) و سایبنن (Sabinene) می‌باشد [13].

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

بیماران مورد بررسی در این مطالعه، از مرکز تحقیقات ایدز واقع در بیمارستان امام خمینی (ره)، در پاییز 1390 به طور غیر تصادفی از 70 بیمار (54 بیمار مرد و 16 بیمار زن) انتخاب شدند. عفونت ایدز در این بیماران قبلاً با روش‌های الیزا و بلا تیگ تأیید شده بود. این بیماران جهت درمان و مشاوره به این مرکز درمانی مراجعه کرده بودند و نمونه‌ها بر اساس وجود ضایعات دهانی - حلقی و با استفاده از سواب تهیه و در اسرع وقت به آزمایشگاه تحقیقاتی قارچ‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران حمل شد. سپس نمونه‌ها بر روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار (Merck) با کلرامفنیکل به صورت خطی کشت داده شد و کلنی‌های رشد کرده بعد از 48 تا 72 ساعت در دمای 35 درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. همچنین آزمایش مستقیم با 10 درصد پتاس و رنگ‌آمیزی گیمسا نیز بر روی نمونه‌ها صورت گرفت.

شناسایی کاندیدا آلیکنس

جهت تشخیص افتراقی کاندیدا آلیکنس از سایر گونه‌های کاندیدا، از محیط کروم آگار کاندیدا استفاده شد و کلنی‌های با رنگ سبز، سبز روشن، سبز تیره و سبز آبی به عنوان کاندیداها مشکوک به کاندیدا آلیکنس، جهت بررسی‌های بیشتر با تست‌های فنوتیپی، بیوشیمیایی و مولکولی انتخاب شدند [14]. این تست‌ها شامل: تولید کلامیدوکنیدی بر روی محیط کورن میل آگار و توئین 80، تولید لوله زایا در مجاورت با سرم انسان در دمای 37 درجه سانتی‌گراد، توانایی رشد در

(5'-ATCCCGCCTTACCACTACCG-3', reverse, CALB2, L28817)

به منظور تقویت یک قطعه 273 bp در ناحیه ژنی
5.8 ribosomal RNA استفاده شد [16].

از کاندیدا آلیکنس ATCC 10231 به عنوان شاهد مثبت و از آب مقطر و چند گونه دیگر کاندیدا به عنوان کنترل منفی استفاده شد. این آزمون در حجم 20 میکرولیتری شامل Buffer 10X، کلرید منیزیم (1.5 mM)، dNTP (0.2 mM)، پرایمر از هر کدام (0.5 μM)، آنزیم Taq DNA پلیمر از 0/5 واحد (محصول شرکت سیناکلون) و 2 میکرولیتر از DNA الگو انجام شد. سیکل‌های گرمایی عبارت بود از سه مرحله: دناتوراسیون اولیه 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه، مرحله دوم شامل: 40 سیکل و هر سیکل شامل سه گام: گام اول، دناتوراسیون اولیه 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه، گام دوم 58 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه و گام سوم، 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه. مرحله سوم: یک امتداد نهایی 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه. واکنش PCR در یک ترموسایکلر مدل (Techne, TC512, England) انجام شد. مقدار 8 میکرولیتر از محصول روی آگارز 1/5 درصد (سیناکلون) در بافر TBE 0.5X به مدت 1 ساعت در ولتاژ 80 الکتروفورز شد. قطعات حاصل از هر نمونه در نهایت پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید با غلظت 0/5 میکروگرم بر میلی‌لیتر به صورت باند فلورسنت در دستگاه ترانس ایلومیناتور مشاهده و ذخیره شد. همچنین جهت صحت کار و عملکرد اختصاصی پرایمرها از چند کاندیدای دیگر مثل کاندیدا دابلینسیس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا کروژی و کاندیدا تروپیکاليس در کنار نمونه‌ها استفاده شد. به عنوان استاندارد وزن مولکولی نیز از نشانگر وزن مولکولی DNA (VC100bp DNA Ladder, Vivantis) استفاده شد.

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیک‌های ضدقارچی به روش انتشار دیسک

این تست بر روی تمام جدایه‌های کاندیدا آلیکنس تأیید شده انجام گرفت. برای این کار از دیسک‌های استاندارد

فلوکونازول، کلوتریمازول، نیستاتین، کتوکونازول، آمفوتریسین B و فلوکسازولین (MAS DIAGNOSTICS) بر اساس روش پیشنهادی (CLSI (NCCLS و روش M44-A انجام شد [17]. سوسپانسیون استاندارد مخمری با غلظت 10⁶ cfu/ml از کشت تازه در لوله‌های استریل حاوی سرم فیزیولوژی با استفاده از روش اسپکتروفوتومتریک تهیه شد، سپس با استفاده از سوپ و غوطه‌ور کردن آن در درون سوسپانسیون و انتقال سوپ بر روی محیط کشت، سلول‌های مخمری را به صورت کاملاً یکنواخت و در تمام جهات کشت داده و بعد از 10 دقیقه که مایع سطحی جذب شد دیسک داروی استاندارد را با پنس استریل در مرکز محیط قرار دادیم. بعد از 24 تا 48 ساعت انکوبه در دمای 35 درجه، قطر هاله ممانعت از رشد را بر حسب میلی‌متر مورد اندازه‌گیری قرار گرفت [17].

تهیه گیاه زنیان و بررسی ترکیبات اسانس زنیان

میوه گیاه زنیان از شرکت پاکان بذر اصفهان به شماره هرباریوم 1-0303-293 خریداری و پس از تأیید خالص بودن بذر، با استفاده از دستگاه کلونجر اسانس‌گیری شد و برای تعیین GC/MS، یک میلی‌لیتر از اسانس تهیه شده به پژوهشکده گیاهان دارویی در استان البرز ارسال و با استفاده از دستگاه Agilent (GC: 6890, Mass: 5973) ترکیبات اسانس شناسایی شد.

تعیین حساسیت ضد قارچی اسانس زنیان به روش انتشار دیسک

ابتدا سوسپانسیون استاندارد مخمری با غلظت 10⁶ cfu/ml بر روی محیط مولر هیتون به طور کامل پخش و در ادامه مقادیر 10 میکرولیتر، 20 میکرولیتر و 30 میکرولیتر از اسانس بر روی کاغذهای بلانک استریل (شرکت پادتن طب) اضافه کرده و پس از جذب شدن اسانس در کاغذ بلانک، آنرا با پنس استریل در مرکز پلیت قرار داده و به مدت 24 تا 48 ساعت در 35 درجه انکوبه شد، پس از دوره انکوباسیون قطر

ساعت انکوبه کردن میکروپلیت‌ها در 35 درجه سانتی‌گراد هم به روش ماکروسکوپی و هم اندازه‌گیری OD به وسیله الیزا بررسی شد. کمترین غلظتی که در آن رشد مخمرها مهار شده بود یعنی رشدی انجام نشده بود به عنوان MIC تلقی شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی (Minimum fungicide concentration: MFC)، مقدار 100 میکرولیتر از غلظتی که به عنوان MIC تعیین شده و همچنین چند غلظت قبل از MIC که با دید ماکروسکوپی هم شفاف به نظر می‌رسید بر روی محیط سابورو دکستروز آگار کشت داده شد و در انکوباتور 35 درجه سانتی‌گراد بعد از 24 تا 48 ساعت، مورد بررسی قرار گرفت. حداقل غلظتی که مانع رشد کاندیدا آلیکس شده بود، به عنوان MFC در نظر گرفته شد [18].

نتایج

در این پژوهش 70 بیمار HIV⁺ مبتلا به کاندیدیازیس دهانی با آزمایش‌های فنوتایپی و ژنوتایپی مورد بررسی قرار گرفت که در نهایت 50 مورد کاندیدا آلیکس شناسایی شد که 42 مورد را مردان و 8 مورد را هم زنان تشکیل می‌دادند. قدرت شناسایی آزمون‌های مورد استفاده در این بررسی از قبیل: کروم آگار کاندیدا 92/5 درصد، تست لوله زایا 94/5، ایجاد کلامیدوکنیدی در محط کورن میل آگار 92/5 درصد، رشد در 45 درجه سانتی‌گراد 87 درصد، تست‌های بیوشیمیایی و جذب قند 92/5 و آزمون PCR 100 درصد مشاهده شد. آزمون PCR با پرایمرهای CALB1 و CALB2 برای 50 DNA کاندیدا آلیکس جدا شده انجام شد و قطعه هدف 273 bp برای کلیه نمونه‌ها با موفقیت تقویت شد (شکل شماره 1).

در تعیین حساسیت ضد قارچی به روش انتشار دیسک، میزان مقاومت در جدایه‌های کاندیدا آلیکس نسبت به فلوکونازول 32 درصد، کتوکونازول 28 درصد و ایتراکونازول 14 درصد بود. درحالی که همه جدایه‌ها نسبت به نیتاتین و

منطقه ممانعت از رشد، بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. این آزمایش بر روی تمام ایزوله‌ها انجام گرفت و نتایج یادداشت شد.

آزمایش میکرودايلوشن براث برای تعیین کمترین غلظت بازدارندگی (Minimum inhibition concentration: MIC)

تهیه رقت اسانس زنیان

این رقت در محیط RPMI به صورت پایلوت از 1000 تا 10000 ppm تهیه و پس از مشخص شدن رنج رقتی مؤثر، برای رسیدن به رقت کارآمد رنج رقت‌سازی را ریزتر کردیم. جهت همگن کردن اسانس در این محیط کشت از 5 DMSO درصد استفاده شد.

آماده‌سازی سوسپانسیون مخمری (Inoculum preparation)

کاندیداها در محیط سابورو دکستروز آگار کشت مجدد داده شد (Sub culture) و به مدت 18 تا 24 ساعت در 35 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سوسپانسیون تلقیحی می‌بایست از طریق برداشت 5 کلنی (با قطری حدود 1 میلی‌متر) از کشت تازه در داخل 10 سی‌سی سرم فیزیولوژی (سالین 0/85 درصد) آماده می‌شد. سوسپانسیون فوق به مدت 15 ثانیه ورتکس شده و میزان تراکم سلولی از طریق روش اسپکتروفتومتری در طول موج 530 نانومتر و یا از طریق روش نیم مک فارلند تعیین تراکم شد، به طوری که در نهایت مقدار سلول‌های مخمری $5 \times 10^6 - 1 \times 10^6$ سلول در هر میلی‌لیتر شد. سپس از سوسپانسیون فوق به ترتیب رقت‌های 1/100 و سپس 1/20 تهیه کرده به نحوی که تراکم نهایی سلول‌های مخمری در هر میلی‌لیتر $0/5 - 2/5 \times 10^3$ CFU/ml به دست آمد.

پخش کردن سوسپانسیون تهیه شده در میکروپلیت‌های 96 خانه‌ای

در هر چاهک 100 میکرولیتر از رقت‌های اسانس تهیه شده و 100 میکرولیتر سوسپانسیون مخمری استاندارد اضافه شد. برای هر مخمر دو چاهک جهت جلوگیری از خطا و به همراه کنترل منفی و مثبت در نظر گرفته شده بود. نتایج پس از 24



شکل شماره 1 - PCR برخی از جدایه‌های کاندیدا آلیکس با استفاده از پرایمر (CALB1 و CALB2)، M: مارکر، P: کنترل مثبت (کاندیدا آلیکس ATCC 10231)، اعداد 1 تا 8 برخی از جدایه‌های کاندیدا آلیکس، 9: کاندیدا گلابراتا، 10: کاندیدا دابلینسیس، 11: کاندیدا کروژی، 12: کاندیدا تروپیکال

آلیکس بودند رشد داشته و کدورت ایجاد کرده بودند. کنترل‌های منفی هم که حاوی محیط کشت RPMI-1640 به همراه اسانس زنیان بود و هیچ‌گونه رشد و کدورتی در این چاهک‌ها مشاهده نشد. در 72 درصد جدایه‌ها (36 نمونه)، کمترین غلظت ممانعت از رشد (MIC)، در رقت 500 ppm و در 28 درصد جدایه‌ها (14 نمونه) 750 ppm بود. پلیت‌های کشت داده شده مربوط به MFC هم مورد بررسی قرار گرفت. حداقل غلظت کشندگی در 70 درصد جدایه‌ها در رقت 750 ppm و در 30 درصد نمونه‌ها هم در رقت 1000 ppm مشاهده شد.

بحث

اهمیت بیماری‌های قارچی فرصت طلب در افراد با ضعف سیستم ایمنی در دو دهه اخیر دارای اهمیت ویژه‌ای شده است. ظهور و شناخت این بیماری‌ها و روند روبه رشد آنها از لحاظ بروز و شیوع در جامعه در چند دهه اخیر، اهمیت رشته قارچ‌شناسی و رابطه تنگاتنگ آن را با علوم بالینی و درمانی نشان می‌دهد [19]. کاندیدیازیس حلقی - دهانی یک عفونت

آمفوتریسین B حساسیت نشان دادند. با توجه به اینکه داروی فلوستوزین به همراه داروهای دیگر مثل فلوکونازول و آمفوتریسین B مصرف می‌شود، استفاده تنهای این دارو باعث مقاومت در بین کاندیداها می‌شود. در این بررسی جدایه‌های کاندیدا آلیکس نسبت به تأثیر تنهای این دارو مقاومت نشان دادند (جدول شماره 1).

در آنالیز ترکیبات اسانس زنیان بر مبنای کروماتوگرافی گازی/طیف سنج جرمی 11 ترکیب در اسانس زنیان شناسایی شد که در این میان، تیمول با 45 درصد، پاراسیمن با 25 درصد و گاماترپین با 18 درصد بیشترین مواد تشکیل‌دهنده اسانس بودند (جدول شماره 2).

تمامی کاندیدا آلیکس‌های جدا شده نسبت به میزان 10 و 20 میکرولیتر از این اسانس در روش انتشار دیسک حساسیت نشان دادند و میزان 30 میکرولیتر از اسانس زنیان به طور کامل از رشد کاندیدا جلوگیری کرده بود (جدول شماره 3). در تعیین حساسیت به اسانس زنیان به روش میکرودایلوشن براث، در تمام میکروپلیت‌ها کنترل مثبت که فقط حاوی محیط کشت RPMI-1640 به همراه کاندیدا

معمول و شایع در بین افراد مبتلا به ویروس HIV می باشد که یکی از مهم ترین عامل ایجاد کننده آن کاندیدا آلبیکنس می باشد [۵،۲۰]. در مطالعه حاضر میزان شیوع کاندیدا آلبیکنس 71/4 درصد دیده شد. در مطالعات دیگر، شیوع کاندیدا آلبیکنس در دهان افراد با علائم دهانی تا 83 درصد و افراد فاقد علائم دهانی از 3 تا 48 درصد گزارش شده است. این میزان در کودکان تا 65 درصد هم اشاره شده است [24 - 21]. موفقیت در شناسایی مخمرها هم به کیفیت آزمایش ها و هم به نوع و وسعت اطلاعات لازم وابسته است. شناسایی کاندیدا آلبیکنس

از چند جهت حائز اهمیت است: 1- حدت در بین گونه ها می تواند متفاوت باشد و شناسایی گونه های حدت دار در جهت درمان و کنترل بخصوص در بین افراد با ضعف سیستم ایمنی مهم می باشد. 2- حساسیت دارویی در بین گونه ها متفاوت می باشد همچنان که بعضی گونه نسبت به بعضی داروها مقاومت ذاتی نشان می دهند مانند مقاومت ذاتی کاندیدا گلابراتا به فلوکونازول و کاندیدا لوزیتانیا به آمفوتریسین B و همچنین حساسیت کاندیدا آلبیکنس نسبت به فلوکونازول کمتر

جدول شماره 1 - الگوی حساسیت کاندیدا آلبیکنس به روش انتشار دیسک

دیسک مصرفی	حساسیت (درصد)	حساسیت نسبی (درصد)	مقاومت (درصد)
فلوکونازول	58	10	32
کتوکونازول	62	10	28
آمفوتریسین B	96	4	-
نیستاتین	100	-	-
کلوتریمازول	70	16	14
فلوسایتوزین	-	-	100

جدول شماره 2 - نتایج آنالیز اسانس زنیان با استفاده از دستگاه GC-MS

ردیف	نام ترکیب	درصد
1	تیمول	45
2	پاراسیمن	25
3	گاما ترپینن	18
4	بتا پینن	1/3
5	بتا فلاندن	0/7
6	سابینن	0/7
7	بتامیرسن	0/5
8	آلفا ترپینن	0/4
9	ترپینن	0/3
10	آلفا پینن	0/3
11	آلفانوژن	0/3

جدول شماره 3 - الگوی حساسیت کاندیدا آلیکس‌های جدا شده از بیماران HIV+ به اسانس زنیان به روش انتشار دیسک

شماره	10 میکرولیتر	20 میکرولیتر	30 میکرولیتر	شماره	10 میکرولیتر	20 میکرولیتر	30 میکرولیتر
1	45 میلی‌متر	53 میلی‌متر	ممانعت از رشد	27	46	50	ممانعت از رشد
2	47	52	ممانعت از رشد	28	47	55	ممانعت از رشد
3	40	50	ممانعت از رشد	29	43	48	ممانعت از رشد
4	46	51	ممانعت از رشد	30	45	51	ممانعت از رشد
5	43	50	ممانعت از رشد	31	50	55	ممانعت از رشد
6	41	49	ممانعت از رشد	32	41	49	ممانعت از رشد
7	46	49	ممانعت از رشد	33	45	53	ممانعت از رشد
8	43	48	ممانعت از رشد	34	50	57	ممانعت از رشد
9	43	52	ممانعت از رشد	35	47	52	ممانعت از رشد
10	44	50	ممانعت از رشد	36	45	51	ممانعت از رشد
11	45	55	ممانعت از رشد	37	43	50	ممانعت از رشد
12	46	51	ممانعت از رشد	38	48	55	ممانعت از رشد
13	47	54	ممانعت از رشد	39	50	55	ممانعت از رشد
14	50	55	ممانعت از رشد	40	43	50	ممانعت از رشد
15	47	52	ممانعت از رشد	41	40	47	ممانعت از رشد
16	45	52	ممانعت از رشد	42	43	48	ممانعت از رشد
17	43	50	ممانعت از رشد	43	45	55	ممانعت از رشد
18	45	50	ممانعت از رشد	44	48	50	ممانعت از رشد
19	43	50	ممانعت از رشد	45	47	52	ممانعت از رشد
20	48	53	ممانعت از رشد	46	45	53	ممانعت از رشد
21	45	49	ممانعت از رشد	47	50	عدم رشد	ممانعت از رشد
22	45	49	ممانعت از رشد	48	42	55	ممانعت از رشد
23	44	50	ممانعت از رشد	49	44	57	ممانعت از رشد
24	45	48	ممانعت از رشد	50	49	عدم رشد	ممانعت از رشد
25	45	48	ممانعت از رشد	ATCC	45	51	ممانعت از رشد
26	43	50	ممانعت از رشد				

پیوندی‌ها و ایدزی‌ها بسیار با اهمیت است. بنابراین جهت شناسایی دقیق و درمان سریع، همچنین پی بردن به منبع عامل عفونت در جهت کنترل بیماری، روش‌های مولکولی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. برای جداسازی گونه‌های کاندیدا آلیکنس در نمونه‌های بالینی، ژن‌های خاصی به کار برده شده است [31 – 28]. در این تحقیق از ژن 5.8 S ribosomal RNA استفاده شد که با حساسیت و ویژگی بسیار بالایی قادر به تفريق کاندیدا آلیکنس بود. توماس (Thomas) و همکاران (2002) از ژن 5.8 S ribosomal RNA (L47111 , L28817) در شناسایی 26 ایزوله، استفاده کرده و حساسیت این روش را 100 درصد گزارش کردند [16]. در ایران هم مطالعاتی در زمینه تشخیص مولکولی کاندیداها صورت گرفته و با توجه به اهمیت تشخیص سریع و دقیق، پیشنهاد تست غربالگری اولیه برای بیماران مبتلا به کاندیدیازیس قبل از مصرف درمان با استفاده از آزمون PCR، پیشنهاد شده است [۳۲،۳۳]. انتخاب یک داروی مناسب، علاوه بر فاکتورهایی مثل شدت بیماری، تأثیرات سمی دارو، روش درمان و همکاری بیمار در دوره درمان، می‌تواند در درمان صحیح بیمار و عدم عود مجدد بیماری نقش مهمی داشته باشد. در این بررسی از 6 داروی استاندارد فلوکونازول، ایتراکونازول، کتوکونازول، آمفوتریسین B و فلوکسیتوزین طبق روش NCCLS و به صورت انتشار دیسک استفاده شد. این روش در صورت استفاده از دیسک‌های استاندارد، می‌تواند روش مطمئنی در آزمایشگاه‌های تشخیصی باشد. روش انجام ساده این تست، خواندن آسان و تکرارپذیری بالا از مزایای این روش می‌باشد. با استفاده از این روش و با توجه به نتایج به دست آمده، میزان مقاومت جدایه‌های کاندیدا آلیکنس به داروی فلوکونازول، کتوکونازول و ایتراکونازول به ترتیب 32، 28 و 14 درصد دیده شد که این میزان مقاومت بالا نسبت به داروهای آزولی نشانه خوبی به نظر نمی‌رسد چرا که داروهای آزولی بخصوص فلوکونازول به دلیل راحتی تجویز، مسمومیت کمتر نسبت به داروهای آزولی دیگر و جذب مناسب گوارشی برای درمان بیماران مبتلا به کاندیدیازیس دهانی مناسب می‌باشد.

از کاندیدا دابلیننسیس می‌باشد هرچند از نظر مورفولوژیکی بسیار شبیه هم هستند [3]. شناسایی کاندیدا آلیکنس با روش‌هایی مثل: ایجاد هایف کاذب، لوله زایا، ایجاد کلامیدوکنیدی، استفاده از محیط‌های اختصاصی مثل کورن میل آگار و آسیمیلایون قندها هرچند ساده به نظر می‌رسد ولی نتایج حاصل آنها کلی و در مواردی قابل اطمینان نیست [25]. در این تحقیق قدرت تفريق با محیط کروم آگار کاندیدا 92/5 درصد مشاهده شد چرا که تفاوت رنگ اندکی بین کاندیدا آلیکنس و کاندیدا دابلیننسیس بر روی این محیط کشت وجود دارد و تنها از روی رنگ کلنی نمی‌توان این دو را از هم تفريق داد [26]. کاندیدا آلیکنس و کاندیدا دابلیننسیس می‌توانند در محیط کورن میل آگار کلامیدوکنیدی ایجاد کنند همچنین کاندیدا گلابراتا در دمای 25 درجه سانتی‌گراد و پس از انکوباسیون در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نیز قادر به این کار است با این تفاوت که دیواره ایجاد شده در کاندیدا گلابراتا نازک‌تر از کاندیدا آلیکنس می‌باشد با این روش نیز 92/5 درصد تفريق شد. رشد در دمای 45 درجه سانتی‌گراد هرچند به عنوان یک حدت برای کاندیدا آلیکنس محسوب می‌شود اما همه آلیکنس‌ها قادر به رشد در این درجه حرارت نیستند، قدرت تفريق این روش هم 87 درصد مشاهده شد. روش ایجاد جرم تیوب در این مطالعه 94/5 درصد مشاهده شد. اگر چه ایجاد لوله زایا از ساده‌ترین و سریع‌ترین روش‌ها در آزمایشگاه‌ها به حساب می‌آید ولی کاندیدا دابلیننسیس هم می‌تواند لوله زایا تولید کند این تست نمی‌تواند تشخیصی برای افتراق این دو کاندیدا باشد. همچنین نشان داده شده که عواملی مانند دما، pH، غلظت گلوکز، هورمون استروژن و غلظت CO₂ می‌توانند در نتایج این تست تشخیصی تأثیرگذار باشند [27]. این تغییرات در مورد کیت‌های بیوشیمیایی هم صادق بود چرا که افتراق کاندیدا آلیکنس از بقیه گونه‌ها 92/5 درصد مشاهده شد. با ایجاد گونه‌های جدید کاندیدیایی و قربات نزدیک آنها از نظر مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی، کار تشخیص سخت‌تر شده و استفاده از روش‌های فوق بسیار زمان‌بر بوده که این مسأله در مورد افراد بیمار در معرض خطر همانند

ترکیبی تهیه می‌شود و اغلب هم مخالف طبع هستند اختلاف دارد. از طرف دیگر مواد مؤثره‌ی موجود در داروهای گیاهی، به دلیل همراه بودن آنها با مواد دیگر، پیوسته از حالت تعادل بیولوژیک برخوردارند لذا در بدن انباشته نشده و اثرات جانبی نیز به همراه ندارند [۹،۳۹].

در تحقیق حاضر تأثیر مهاری اسانس زنیان بر رشد کاندیدا آلبیکنس به دو روش دیسک دیفیوژن و میکرودايلوشن براث به اثبات رسید. در روش دیسک دیفیوژن مقدار 10 میکرولیتر و 20 میکرولیتر از این اسانس در روی محیط کشت، منطقه ممانعت از رشد قابل قبولی را در برابر کاندیدا آلبیکنس را ایجاد نمود. مقدار 30 میکرولیتر از این اسانس، رشد کاندیدا آلبیکنس را به طور کامل در محیط کشت متوقف می‌کرد به طوری که یک کلنی از کاندیدا آلبیکنس هم در محیط کشت مشاهده نشد. میزان MIC در 72 درصد جدایه‌ها 500 PPM و در 28 درصد دیگر 750 PPM مشاهده شد. همچنین میزان MFC هم در 70 درصد جدایه‌ها 750 PPM و در 30 درصد دیگر 1000 PPM گزارش شد. چندین مطالعه در زمینه اثرات ضد میکروبی گیاه *T. ammi* صورت گرفته است و در تمام این تحقیق‌ها اثر ضد باکتریایی، ضد انگلی، ضد قارچی و ضد ویروسی اسانس یا عصاره استخراج شده این گیاه به اثبات رسیده است [۴۰،۴۱،۴۲]. مؤذنی و همکاران (2012) اثر کشندگی اسانس زنیان را بر روی پروتواسکولیس‌های کیست هیداتید انجام داده و گزارش کردند که اسانس زنیان با سه ماده اصلی تیمول، ترپینن و سیمن قدرت کشندگی بالایی را داراست و می‌توان از این اسانس به عنوان یک داروی طبیعی استفاده نمود [43]. محبوبی و همکاران (2011) اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی دو اسانس زنیان و آویشن را بر روی تعدادی از باکتری‌های گرام مثبت و گرام منفی (ATCC) و همچنین کاندیدا آلبیکنس ATCC 10231، کاندیدا گلابراتا و اسپرجیلوس را به روش میکرودايلوشن براث گزارش کردند. طبق گزارش‌های این مطالعه، اسانس زنیان اثر ضد میکروبی بالاتری نسبت به آویشن را داشت [44]. در مطالعه ما نیز اسانس گیاه زنیان اثرات مشابهی را بر روی جدایه‌های مقاوم و

مقاومت‌های آزولی در بیماران کاندیدیازیس دهانی روز به روز در حال افزایش بوده و این مسأله یکی از مشکلات مهم درمان در بین بیماران ایدزی نیز می‌باشد [34]. مطالعات گسترده‌ای در این زمینه هم صورت پذیرفته است و در تمام بررسی‌ها به افزایش مقاومت دارویی آزولی اشاره شده است [35]. میزان مقاومت کاندیدا آلبیکنس به داروهای پلی آن مانند نیستاتین و آمفوتریسین B بسیار نادر می‌باشد که در مطالعات دیگر نیز به آن اشاره شده است [36]. در این مطالعه هم حساسیت 100 درصدی تمام جدایه‌ها به این دو دارو حاکی از این مطلب می‌باشد. میزان مقاومت بالای جدایه‌های کاندیدا آلبیکنس به داروی فلوستوزین، مقاومت ذاتی آنها را نسبت به این دارو نشان می‌دهد و استفاده این دارو به تنهایی، تأثیر چندانی بر روی کاندیدا ندارد. با توجه به اثرات سینرژیستی این دارو با داروهای دیگر بخصوص آمفوتریسین B، در درمان سیستمیک استفاده می‌شود. اگرچه مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها موجب بهبودی و برطرف شدن عوامل عفونی و عفونت می‌شود ولی همین امر باعث پدیدار شدن میکروارگانیسم‌های مقاوم شده و باعث عدم موفقیت در درمان و عود مجدد بیماری می‌شود از طرف دیگر طولانی بودن دوره‌های درمان قارچی و ایجاد ضعف و ناتوانی در بیماران، عدم تمایل آنها را در ادامه درمان به همراه دارد. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده است که اغلب عفونت‌های مهم قارچی توسط گونه‌های مقاوم به داروهای ضدقارچی ایجاد می‌شود. این موضوع بخصوص در مورد کاندیدا آلبیکنس و مقاومت آنها نسبت به داروی فلوکونازول مورد تأیید قرار گرفته است [۳۷،۳۸]. درمان با گیاهان دارویی از زمان‌های دیرین تاکنون در ایران رایج و از حیث آسانی و فراگیری در درجه اول اهمیت بوده است در سال‌های اخیر تحقیق در مورد داروهای گیاهی به سرعت افزایش یافته و به منظور استفاده از مواد شیمیایی گیاهی و پیشرفت در جهت درمان بیماری‌های عفونی، رابطه تنگاتنگی بین گیاهشناسان، داروسازان، شیمی‌دانان و میکروبی‌شناسان ایجاد شده است [39]. مواد موجود در گیاهان، طبیعی و موافق طبع بشر بوده و به طور مسلم اثراتش با اثرات حاد موادی که به صورت شیمیایی و

گیرد. اجزای اصلی تشکیل‌دهنده اسانس زنیان سه ماده تیمول، پاراسیمین و گاما ترپنین می‌باشد. به نظر می‌رسد که این مواد باعث شکاف و جدایی در لایه خارجی میکروارگانیسم شده و به دنبال آن تجزیه غشاء خارجی و تراوش و جمع‌شدگی سیتوپلاسمی اتفاق می‌افتد. بر اساس نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد اسانس زنیان می‌تواند رشد کاندیدا آلیکنس را با مکانیسمی مشابه با فلوکونازول مهار نماید. همچنین در این تحقیق مشاهده شد که اثر کشندگی اسانس زنیان بر کاندیداهای مقاوم به آزول همانند کاندیداهای حساس به این دارو می‌باشد. بنابراین اسانس زنیان می‌تواند به عنوان یک عامل ضد قارچی مؤثر بدون توجه به مقاومت‌های آزولی به همراه داروهای ضد میکروبی تجویز شود.

حساس به فلوکونازول از خود نشان داد. مورچی و همکاران (2009) اثر ضد قارچی عصاره اتانلی گیاه *T. ammi* را بر روی اسپرجیلوس اوکراسئوس مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که در 250 PPM به طور کامل رشد قارچ و جرمینه شدن اسپورها و همچنین تولید اوکراتوکسین A متوقف شده است. آنها بیان کردند وجود 125 mg/gr از این عصاره در مواد غذایی مانند ذرت و دان طیور، از رشد اسپرجیلوس اوکراسئوس جلوگیری می‌کند [45]. در بررسی حاضر، اسانس گیاه زنیان در غلظت 500 ppm اثرات مهاری بر رشد اکثر جدایه‌های دهانی داشت. این نتیجه با نتایج محبوبی و همکاران در سال 2011 مطابقت دارد به علاوه چنین به نظر می‌رسد که اسانس این گیاه به دلیل مقدار بالای تیمول می‌تواند به عنوان ترکیبی مؤثر در کنترل کاندیدایزیس مخاطی مورد استفاده قرار

منابع

1. Dalle F, Franco N and Lopez J. Comparrative genotyping of *Candida albicans* bloodstream and non- bloodstream isolates at a polymorphic microsatellite locus. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38: 4554 - 9.
2. De Marie S. New development in the diagnosis and management of invasive fungal infections. *Haematologyca* 2000; 85 (1): 88 - 93.
3. Calderone RA. *Candida and Candidiasis*. Washington: ASM Press. 2002.
4. Karahan ZC, Guriz H, Agirbasli H, Balaban N, Gocmen JS, Aysev D and et al. Genotype distribution of *Candida albicans* isolates by 25S intron analysis with regard to invasiveness. *Mycoses* 2004; 47: 465 - 9.
5. Sanchez-Vargas LO, Ortiz-Lopez NG, Villar M, Moragues MD, Aguirre JM, Cashat-Cruz M and et al. Point prevalence, microbiology and antifungal susceptibility patterns of oral *Candida* isolates colonizing or infecting Mexican HIV/AIDS patients and healthy persons. *Rev. Iberoam Micol.* 2005; 22 (2): 83 - 92.
6. Barr C E, Torosian MP. Oral manifestatios in patients with AIDS or AIDS related complex. 1986; *Lancet* 2: 288.
7. Martin MV and Wilkinson JR. The Oral Yeast Flora of 10-year-old School Children. *Sabouraudia* 1983; 21 (2): 129 - 35.
8. Pandooneh A, Zuhair MH and Taghi A. The effect of molecule isolated from garlic on the survival of the transplanted alogenic in Balb/c mice. *Kowsar Medical Journal* 1996; 2: 119 - 27. (Persian).
9. Roberto CH. medicinal plants photo dictionary. Traditional Medicine & Materia Medica Research Center Tehran University of Medical Sciences 2005; (Persian).
10. Amin Gh. Iranian traditional medicine plant. Minstry of Health and Educational Medica Science, Reaserch Exoress, Tehran, Iran. 1993, (1): 115. (Persian).
11. Zargari A. Medicinal Plants. Tehran University, Tehran, Iran. 1988, (1): 749. (Persian).

12. Amini S. Analysis and identification of essential oil of *Carum copticum* components by GC/MS. Presented for the Ph.D., Tehran, Medical Sciences University of Tehran. 1997. (Persian).
13. Balbba SI, Hilal SH and Hoggag MR. Active constituents of Ammi majus fruit at differet stages. *Acta Medica* 1973; 23 (4): 372 - 80.
14. Mirhendi H, Makimura K, Khoramizadeh M and Yamaguchi H. A one- enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species. *Jpn J. Med. Mycol.* 2006; 47: 225 - 9.
15. Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34: 58 - 61.
16. Tomas G. Mitchell and Guizhen Luo. Rapid Identification of Pathogenic Fungi Directly from Cultures by Using Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 2860 - 5.
17. NCCLS Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Second Edition. *NCCLS Document M27-A2, NCCLS, Wayne, PA.* 2002.
18. Kuriyama T, Williams DW, Bagg J, Coulter WA, Ready D and Lewis MA. In vitro susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. *Oral. Microbiol. Immunol.* 2005; 20 (6): 349-53.
19. Pfaller MA. Epidemiology of Candidiasis. *J. Hosp. Infect.* 1995; 30: 329 - 38.
20. Gughani HC, Becker K, Fegeler W, Basu S, Chattopadhyay D, Baveja U, Satyanarayana S, Kalghatgi T and Murlidhar A. Oropharyngeal carriage of *Candida* species in HIV-infected patients in India. *Mycoses* 2003; 46 (8): 299 - 306.
21. Topely & Wilson's, Medical Mycology. Chapter: 23, p: 423.
22. Luis Octavio Sanchez-Vargas, Natalia Guadalupe Ortiz-Lopez, et al. Point prevalence, microbiology and antifungal susceptibility patterns of oral *Candida* isolates colonizing or infecting Mexican HIV/AIDS patients and healthy persons. *Rev. Iberoam. Micol.* 2005; 22: 83 - 92.
23. Domaneschi C, Massarente DB and et al. Oral colonization by *Candida* species in AIDS pediatric patients. *Oral. Dis.* 2011; 4: 393 - 8.
24. Carolina Rodrigues Costa, Janine de Aquino Lemos, Xisto Sena Passos and et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of oral *Candida* isolates from HIV- infected patients in the antiretroviral therapy era. *Mycopathologia* 2006; 162: 45 - 50.
25. Fujita SI, Lasker BA, Lott TJ and Morison CJ. Microtitration plate enzyme immunoassay to detect PCR-amplified DNA from *Candida* species in blood. *J. Clin. Mic.* 1995; 33: 962 - 7.
26. Mirhendi H, Makimura K, Zomorodian K, Yamaguchi H. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* using a single PCR-Restriction enzyme. *Jap. J. Infect. Dis.* 2005; 58: 235 - 57.
27. Calderone RA. *Candida* and Candidiasis. ASM Press, Washington D.C. 2002.
28. Caldron RA. *Candida* and Candidiasis. 2002; Chapter: 2, pp: 15 - 25.
29. Chen YC, Eisner CJ, Katter M, Barrett K and Kafe KS. Identification of Medically important yeasts using PCR based detection of DNA sequence polymorphism in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J. Clin. Mic.* 2000; 38: 2302 - 10.
30. Morace J, Sangvinettio M and Posteraro B. Identification of various medically *Cndida* species by PCR-restriction enzyme analysis. *J. clin. Mic.* 1997; 35: 667 -72.
31. Van Deventer AJ, Goessens VHF, Belkum AV and Verbrugh HA. Improved detection of *Candida albicans* by PCR in blood of neutropenic mice with

- systemic candidiasis. *J. Clin. Mic.* 1995; 33: 625 - 8.
32. Eskandari A, Mesbah Namin SA and Yadegari MH. Identification of important pathogenic *Candida* spp. in patients with acute candidiasis by PCR. *Kosar Medical J.* 2006; 13 (2): 115 - 24. (Persian).
 33. Mirhendi SH, Makimora K, Shidfar MR and Hosinpor L. Identification of pathogenic *Candida* spp. with PCR-FSP. *Tehran University of Medical J.* 2006; 66 (9): 639 - 645. (Persian).
 34. Juhaer M, Xiong MP, Alshat E, Takashi Y, Hiroji C and Reiko T. Genotyping of fluconazole - resistant *Candida albicans* isolated from uighurian people in China using ALTS/RFLP and Micro-TGGE metod. *Jpn. J. Med. Mycol.* 51: 165 - 8.
 35. Goff DA, Koletar SL, Buesching WJ, Barnishan J, Fass RJ. Isolation of fluconazole-resistant *Candida albicans* from human immunodeficiency virus-negative patients never treated with azoles. *Clin. Infect. Dis.* 1995; 20: 77 - 83.
 36. Nolte FS, Parkinson T, Falconer DJ and et. al. Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41: 196 - 9.
 37. Dassanayake RS, Ellepola AN, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Molecular heterogeneity of fluconazole-resistant and susceptible oral *Candida albicans* isolates within a single geographic locale. *APMIS.* 2002; 110: 315 - 24.
 38. Morshhauser J. The genetic basis of fluconazole-resistant development in *Candida albicans*. *Biophysica Acta.* 2002; 1587: 240-8.
 39. Daryayi MR. Miracles of medicinal plants in Iranian medicine. *Tajasom Khalagh Tehran publication.* 2007. Second edition.
 40. Iacobellis NS, Lo CP, Capasso F and Senator F. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. Essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53 (1):57-61.
 41. Navarro V, Villarreal ML and Royas G. Antimicrobial evaluation of some plants used Mexican traditional medicine for the treatment of the infections discases. *J. Ethnopharmacol.* 1996; 53: 143-7.
 42. Pattanki S and Subramanyam VR. Antibacterial and antifungal activity of ten essential oil in vitro. *Microbios.* 1996; 86: 237 - 46.
 43. Mohammad Moazeni, Mohammad Jmal Saharkhiz, Ali Akbar Hosseini. InVitro Lethal effect of ajowan (*Trachyspermum ammi* L.) essential oil on hydatid cyst protoscoleces. *J. Vetpar.* 2012; 6198 - 5.
 44. Mahboubi M and Kazempour N. Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* and *Trachyspermum copticum* essential oil. *Int. J. Mic.* 2011; 4 (3): 194 - 200.
 45. Pushpa Srinivas Murthy, et. Al. Inhibitory effects of Ajowan (*Trachyspermum ammi*) ethanolic extract on *A. ochraceus* growth and ochratoxin production. *Turk. J. Biol.* 2009; 33: 211 - 7.