

بررسی اثر کشنده‌گی عصاره و اسانس گیاه زنیان بر روی کیست ژیاردیا لامبیا در شرایط آزمایشگاهی

دکتر ساعد شهابی^۱، فاطمه ایازی روزبهانی^{۲*}، مهندس محمد کمالی نژاد^۳، دکتر علیرضا ابدی^۴

^۱ گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

^۲ بیمارستان شهید دکتر لواسانی، سازمان تأمین اجتماعی

^۳ گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

^۴ گروه بهداشت و پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: ژیاردیازیس عفونت انگلی روده کوچک با انتشار جهانی است که توسط تکیاخته تازکداری بنام ژیاردیا لامبیا در انسان ایجاد می‌شود. بررسی‌های مبین آن است که شیوع ژیاردیا لامبیا در نقاط مختلف جهان بین یک تا ۲۵٪ جمعیت متغیر است. ژیاردیازیس در بین کسانی که در مناطق پرجمعیت و با تسهیلات بهداشتی کم زندگی می‌کنند، بیشترین شیوع را دارد. این تکیاخته یکی از عوامل مهم ایجاد‌کننده اسهال بخصوص در کودکان سنین دبستان است. درمان دارویی این بیماری معمولاً بر اساس تجویز مترونیدازول صورت می‌گیرد که دارای اثرات جانبی متعدد است.

روش بررسی: در این مطالعه که به روش تجربی انجام شد، از گیاه زنیان با نام علمی *Carum copticum* (L.) C.B. Clark که دارای خواص ضد باکتریایی، ضد کرم و ضد قارچی به واسطه مواد فنیک آن مثل تیمول و کارواکرول است، استفاده گردید. در این تحقیق در شرایط آزمایشگاهی، اثر عصاره هیدرولکلی، آبی و اسانس گیاه خوارکی زنیان بر علیه کیست ژیاردیا مورد ارزیابی قرار گرفته است. **یافته‌ها:** پس از گذشت ۶۰ دقیقه از تماس بین عصاره یا اسانس با کیست ژیاردیا لامبیا، حداقل غلظت مهاری (MIC) عصاره هیدرولکلی و اسانس زنیان به ترتیب mg/ml ۱۰۰ و ۸، پس از ۱۲۰ دقیقه به ترتیب ۷۵ و ۶، و پس از ۱۸۰ دقیقه به ترتیب ۷۵ و ۴ به دست آمد.

نتیجه‌گیری: عصاره‌های الكلی و اسانس زنیان در محیط آزمایشگاه دارای اثر کشنده‌گی بر روی کیست ژیاردیا لامبیا هستند.

واژگان کلیدی: ژیاردیا لامبیا، ژیاردیازیس، گیاه زنیان، حداقل غلظت مهارکننده، درمان، ضد انگل.

مقدمه

همچنین، گروه متنوعی از عوامل اتیولوژیک از جمله تراکم جمعیت، نوع آب و هوا، وضعیت اقتصادی و بهداشت، شرایط مساعد آسودگی به این انگل را فراهم می‌کنند (۴ و ۵). آسودگی با این انگل در تمام نقاط جهان گزارش شده است و میزان آسودگی افراد در نقاط مختلف، ۱-۲۵٪ می‌باشد. در ایران آسودگی در بیشتر نقاط کشور گزارش شده است (۶). برای درمان این بیماری از داروهای کیناکرین، مترونیدازول و فورازولیدون استفاده می‌شود که داروهای فوق همگی دارای اثرات نامطلوب بویژه در کودکان و زنان هستند. لذا مصرف برخی از آنها در دوران بارداری ممنوع است (۷ و ۸).

ژیاردیازیس، عفونت انگلی روده کوچک تعداد زیادی از مهره‌داران به انضمام انسان با انتشار جهانی است که توسط تکیاخته تازکداری بنام ژیاردیا لامبیا ایجاد می‌شود (۲ و ۳). انتقال بیماری از شخص به شخص، یا از طریق مصرف آب و غذای آسوده صورت می‌گیرد. این انگل، مهمترین عامل اسهال در کودکان، مسافران و افراد هم‌جنس باز محسوب می‌شود (۳).

* نویسنده مسئول مکاتبات: فاطمه ایازی روزبهانی؛ تهران، اتویان شهید یاسینی (سرخه‌حصار)، بیمارستان شهید دکتر لواسانی؛ پست الکترونیک: fatti.ayazi@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۶/۱۱/۲۱

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۴/۲۵

در این مطالعه، گیاه زنیان با نام علمی (*Carum copticum*) (L.) C.B. Clark از پژوهشکده گیاهان دارویی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهیه شد. شناسایی و تأیید نام آن نیز توسط متخصصین آن مرکز صورت گرفت. از گیاه زنیان، عصاره‌های آبی، هیدروالکلی و اسانس به روش‌های معمول تهیه شد (۱۵).

برای بررسی تأثیر عصاره گیاه زنیان بر روی کیست‌های ژیاردیا لامبیا، در ابتدا غلظت‌های مختلف از عصاره گیاه زنیان را به میزان یک میلی لیتر در لوله‌های آزمایش، تهیی کرده و سپس، حدود ۵۰۰۰ عدد کیست زنده ژیاردیا به لوله‌های حاوی محلول اضافه شد. یک لوله کنترل حاوی آب مقطر و انگل که هیچ ماده‌ای به آن اضافه نشده بود نیز به عنوان گروه شاهد در هر سری آزمایش در نظر گرفته شد. لوله‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و شمارش تعداد انگلهای زنده و مرده در زمان‌های ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه صورت گرفت. در بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه زنیان از غلظت ۱۰ mg/ml تا غلظتی که باعث از بین بردن ۱۰۰٪ کیست‌های زنده شود استفاده شد و حداقل غلظتی که کشنده‌گی کیست‌ها را ۱۰۰٪ داشت به عنوان MIC در نظر گرفته شد و غلظت‌های $\frac{1}{2}$ ، $\frac{1}{4}$ و $\frac{3}{4}$ آن نیز مورد بررسی قرار گرفت.

اسانس، یک ترکیب روغنی است که در آب نامحلول است. به همین دلیل از توابیین ۸۰ با غلظت ۵٪ به عنوان حلal استفاده می‌شود. پس از تهیه رقت‌های مورد نظر از اسانس به میزان یک میلی لیتر، در لوله‌های آزمایش حدود پنجاه هزار عدد کیست زنده ژیاردیا به هر لوله اضافه شد. یک لوله کنترل حاوی توابیین ۸۰ و انگل که هیچ ماده‌ای به آن اضافه نشده بود. نیز به عنوان گروه شاهد در هر سری آزمایش منظور گردید. لوله‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و شمارش تعداد انگلهای زنده و مرده در زمان‌های ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه صورت گرفت. در بررسی تأثیر اسانس گیاه زنیان از غلظت ۱ mg/ml تا غلظتی که باعث از بین بردن ۱۰۰٪ کیست‌های زنده شود، استفاده شد و حداقل غلظتی که در آن غلظت، ۱۰۰٪ کیست‌ها کشته می‌شوند، به عنوان MIC در نظر گرفته شد و غلظت‌های $\frac{1}{2}$ ، $\frac{1}{4}$ و $\frac{3}{4}$ آن نیز مورد بررسی قرار گرفت.

برای تعیین حیات کیست‌ها از رنگ آمیزی حیاتی کیست‌ها با ائوزین ۱٪ استفاده شد.

تعداد کیست‌های زنده و مرده (رنگ گرفته)، با شمارش تصادفی ۱۰۰ عدد کیست ژیاردیا مشخص می‌شود. به منظور

از طرفی گزارش‌هایی از مقاومت این انگل نسبت به داروهای فوق وجود دارد و اثرات کارسینوژنیک و موتازنیک برخی از آنها در مدل‌های حیوانی به تأیید رسیده است. لذا تلاش برای یافتن ترکیباتی که دارای اثرات جانبی کمتر یا بدون اثرات جانبی باشد، همیشه مد نظر بوده است. در سال‌های اخیر استفاده از داروهای گیاهی جهت درمان ژیاردیازیس به واسطه اثرات جانبی کم آنها رو به افزایش است.

زنیان با نام علمی *Carum copticum* متعلق به خانواده چتریان می‌باشد. عصاره میوه این گیاه بصورت ضماد در التیام درد به کار می‌رود (۹). برای میوه این گیاه اثرات ضد تهوع، ضد کرم، مدر و اثر مقوی قوه باء قائلند (۱۰). میوه (بذر) گیاه زنیان دارای اسانس است. بیشترین میزان اسانس گیاه در بذر آن وجود دارد و مقدار آن با توجه به خصوصیات ژنتیکی و محیطی بین ۲ تا ۵ درصد متغیر است. اهمیت گیاه زنیان به علت اسانس و ترکیب‌های موجود در اسانس آن است. از ترکیب‌های عمدۀ اسانس این گیاه، تیمول، ترپین، فلاتدرن، گروه پین، گروه سیمن و میرسن هستند که عمدتاً از منوترپین‌های اکسیئن می‌باشند (۱۱).

تعداد ترکیب‌های موجود در اسانس در منابع از ۱۱ تا ۱۷ مورد گزارش شده است. همچنین مقدار تیمول موجود در اسانس آن در منابع مختلف $۴۱/۷$ ، $۴۵/۲$ و $۳۹/۳$ درصد ذکر گردیده است. در مطالعات انجام شده، اسانس زنیان شامل ۱۱ ترکیب که تیمول $۴۵/۲$ و دلتاسیمن $۴۱/۹$ درصد از ترکیب‌های اصلی آن بودند بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی تأثیر داشته و از رشد چند قارچ مهم جلوگیری نموده است (۱۱-۱۳).

در این تحقیق، اثر اسانس و عصاره زنیان بر روی کیست ژیاردیا لامبیا، برای اولین بار مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

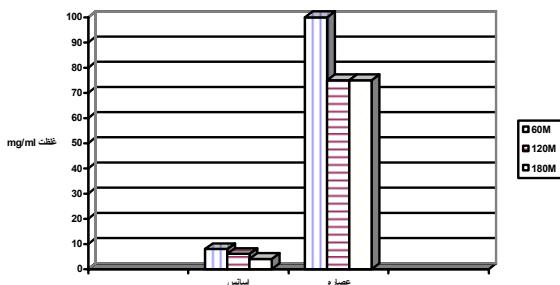
این تحقیق یک مطالعه تجربی است که با استفاده از کیست‌های ژیاردیا از منبع انسانی (لامبیا) انجام شد. این امر با مراجعه روزانه به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهرستان دورود و بروجرد در سال ۱۳۸۵ با جمع‌آوری نمونه‌های مثبت انجام گرفت.

بعداز انتخاب مدفوع آلووده به تعداد فراوان کیست ژیاردیا لامبیا با استفاده از روش می‌بر، کیست‌های انگل از مدفوع جدا شد (۱۴).

زنیان با غلظتی تقریباً معادل $\frac{1}{12}$ عصاره هیدروالکلی پس از ۶۰ دقیقه، ۱۰۰٪ کیستهای ژیاردها را از بین می‌برد. مقایسه تعداد کیست زنده بعد از اضافه کردن غلظت‌های مختلف عصاره آبی زنیان با گروه شاهد پس از زمان‌های ۶۰، ۱۸۰ و ۱۲۰ دقیقه تفاوت چندانی نداشت. نتایج نشان می‌داد که عصاره آبی زنیان اثر چندانی روی کیست ژیاردها ندارد. بالاترین غلظت استفاده شده از عصاره آبی زنیان 700 mg/ml بود. درصد کشنندگی انگل بعد از اضافه کردن غلظت‌های مختلف عصاره آبی زنیان پس از زمان‌های ۶۰، ۱۸۰ و ۱۲۰ دقیقه نشان می‌دهد عصاره هیدروالکلی زنیان در بالاترین غلظت استفاده شده (700 mg/ml) پس از ۱۸۰ دقیقه، حداقل ۱۰٪ کیست‌ها را می‌کشد.

جدول ۱) مقایسه حداقل درصد کشنندگی (MIC) و غلظت‌های $\frac{1}{4}$ ، $\frac{1}{2}$ و $\frac{3}{4}$ عصاره هیدروالکلی و اسانس گیاه زنیان، در زمان‌های ۶۰، ۱۲۰، ۱۸۰ و ۱۲۰ دقیقه

درصد کشنندگی بر حسب زمان (دقیقه)		غلظت (mg/ml)		زنیان
۱۸۰	۱۲۰	۶۰		
۹۶/۵	۷۵/۶	۵۲/۹	۲	
۱۰۰	۹۵/۱	۸۰/۲	۴	اسانس
۱۰۰	۱۰۰	۹۵/۵	۶	
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	(MIC) ۸	
۷۵	۶۳/۷	۲۶/۵	۲۵	
۹۵/۷	۹۳/۸	۷۶/۶	۵۰	عصاره
۱۰۰	۱۰۰	۹۴/۱	۷۵	هیدروالکلی
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	(MIC) ۱۰۰	



نمودار ۱) مقایسه غلظت‌هایی از عصاره هیدروالکلی و اسانس زنیان که موجب از بین رفتن ۱۰۰٪ کیست‌های زنده ژیاردها شده‌اند. در زمان‌های ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه

دقت بیشتر، هر آزمایش ده بار تکرار گردید. درصد زوال کیست‌ها از فرمول زیر محاسبه شد (۱۶):

$$K \% = \frac{MCC - MCT}{MCC} \times 100$$

در فرمول فوق:

$K\% =$ درصد کشنندگی کیست‌ها
 $MCC =$ میانگین تعداد کیست‌های زنده در گروه شاهد
 $MCT =$ میانگین تعداد کیست‌های زنده در گروه آزمون
 در این مطالعه، داده‌ها با استفاده از روش آنالیز واریانس و مقایسات چندگانه با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای رسم نمودار از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

یافته‌ها

جدول ۱، حداقل درصد کشنندگی غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی و اسانس زنیان در مقایسه با گروه شاهد در دوز MIC و غلظت‌های $\frac{1}{4}$ ، $\frac{1}{2}$ و $\frac{3}{4}$ آن را نشان می‌دهد.

در هر ۴ غلظت اسانس با انجام آنالیز واریانس میانگین تعداد انگل زنده با گروه شاهد دارای اختلاف معنی دار بود (P<0.001). با انجام آزمون مقایسات چندگانه نیز اختلاف میان گروه شاهد با غلظت‌های مختلف معنی دار مشاهده شد (P<0.001).

در هر ۴ غلظت عصاره هیدروالکلی زنیان، با انجام آنالیز واریانس، میانگین تعداد انگل زنده با گروه شاهد دارای اختلاف معنی دار بود (P<0.001). با انجام آزمون مقایسات چندگانه نیز اختلاف میان گروه شاهد با غلظت‌های مختلف معنی دار مشاهده شد (P<0.001).

جدول ۱، درصد کشنندگی انگل بعد از اضافه کردن غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی و اسانس زنیان را پس از ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه نشان می‌دهد: اسانس زنیان با غلظت 8 mg/ml پس از ۶۰ دقیقه، با غلظت 6 mg/ml پس از ۱۲۰ دقیقه و با غلظت 4 mg/ml پس از ۱۸۰ دقیقه، ۱۰۰٪ کیست‌های ژیاردها را از بین می‌برد.

عصاره هیدروالکلی زنیان با غلظت 100 mg/ml پس از ۶۰ دقیقه، با غلظت 75 mg/ml پس از ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه، ۱۰۰٪ کیست‌های ژیاردها را از بین می‌برد.

بررسی MIC عصاره هیدروالکلی و اسانس گیاه زنیان نشان می‌دهد که تفاوت معنی داری بین MIC عصاره الكلی گیاه زنیان با اسانس آن وجود دارد (P<0.001). به طوریکه اسانس

بحث

در این تحقیق اثر گیاه زنیان بر روی کیست ژیارديا لامبیا در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت و عصاره آبی، الکلی و اسانس زنیان در غلظت‌های مختلف در زمان‌های ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه بررسی شد.

تحقیقات نشان داده‌اند که اسانس زنیان شامل ۱۱ ترکیب که تیمول و دلتاسیمن از ترکیب‌های اصلی آن بودند، بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی تأثیر دارد و از رشد چند قارچ جلوگیری می‌نماید (۱۱ و ۱۲). در طب سنتی، زنیان به عنوان ضد نفخ، ضد تهوع، مقوی، ضد کرم، مدر، کاهش‌دهنده کلسترول خون، خلط‌آور و تسکین‌دهنده اسپاسم استفاده می‌شود. این گیاه، محرك اشتها بوده و میوه گیاه به طور سنتی به عنوان طعم‌دهنده در غذا به کار می‌رود و اثرات ضد باکتریایی، ضد انگلی و ضد قارچی آن به تأیید رسیده است (۱۰ و ۹).

در این تحقیق میزان غلظتی از عصاره الکلی و اسانس گیاه زنیان، که توانایی کشتن ۱۰۰٪ از کیست‌های ژیارديا لامبیا را دارد، مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که اثر کشندگی اسانس زنیان از عصاره الکلی آن بیشتر بود. به طوری که نتایج ۶۰ دقیقه بعد از اضافه کردن عصاره و اسانس زنیان، نشان دادند که عصاره الکلی با غلظت ۱۰۰ mg/ml و اسانس زنیان با غلظت ۸ mg/ml باعث زوال کیست‌های ژیارديا به میزان ۱۰۰٪ می‌شوند.

در مرحله بعد، نتایج ۱۲۰ دقیقه بعد از اضافه کردن عصاره و اسانس زنیان، نشان داد که عصاره الکلی با غلظت ۷۵ mg/ml و اسانس زنیان با غلظت ۶ mg/ml نیز ۱۰۰٪ از کیست‌های ژیارديا را از بین می‌برد. در مرحله بعد، نتایج ۱۸۰ دقیقه بعد از اضافه کردن عصاره الکلی نشان داد که غلظت ۷۵ mg/ml از عصاره الکلی و غلظت ۴ mg/ml از اسانس زنیان باعث زوال کیست‌های ژیارديا به میزان ۱۰۰٪ می‌شود.

در گزارش‌های موجود، آویشن، گیاهی است که عصاره و اسانس آن، اثرات مشابهی با نتایج به دست آمده در این مطالعه دارد. در تحقیق فرسنگی و همکاران در دانشگاه علوم پزشکی بوشهر (۱۳۸۰)، اثر کشندگی اسانس و عصاره جوشانده آویشن بر روی کیست ژیارديا در شرایط آزمایشگاهی معرفی کرده و جهت استفاده کلینیکی از اسانس و عصاره این گیاه انجام تحقیقات بیشتری ژیارديا در شرایط آزمایشگاهی معرفی کرده و جهت استفاده همچون بررسی مواد شیمیایی مؤثر در اسانس و عصاره گیاه زنیان، بررسی اثر اسانس و عصاره گیاه زنیان روی تروفوزوئیت ژیارديا لامبیا، تغییرات حاصل از حرارت‌دادن اسانس و عصاره گیاه زنیان و ... را توصیه نمود.

بررسی اثر کشندگی عصاره و اسانس گیاه زنیان

اسانس آویشن اثر کشندگی بیشتری نسبت به عصاره آن دارد (۱۷). مهمترین ترکیب اصلی گیاه آویشن، همانند گیاه زنیان، تیمول موجود در آن است که بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، مؤثر است و از رشد چند نوع قارچ نیز جلوگیری می‌کند.

نکته قابل توجه در این تحقیق این است که هر چه زمان مجاورت انگل با عصاره و اسانس زنیان طولانی‌تر باشد، با غلظت کمتری از آنها می‌توان رشد انگل را در محیط کشت مهار کرد. نتایج تحقیقات فرسنگی نیز نشان دهنده این است که زمان، تأثیر بسیار مهمی در کشتن کیست‌های ژیارديا دارد (۱۷).

همین طور در این مطالعه مشخص شد که عصاره آبی زنیان اثر کشندگی بر روی کیست‌های ژیارديا ندارد و احتمالاً علت اصلی عدم تأثیر عصاره آبی بر روی کیست‌های ژیارديا این است که ماده مؤثره موجود در گیاه زنیان، در آب حل نمی‌شود و جوشاندن و حرارت‌دادن آن جهت تهیه عصاره آبی منجر به تبخیر و خروج مواد مؤثره گیاه از آن می‌گردد. این نتیجه، مشابه نتیجه فرسنگی و همکاران در دانشگاه علوم پزشکی بوشهر است که در مطالعه اثر گیاه آویشن بر روی کیست ژیارديا مشخص گردید عصاره جوشانده گیاه، اثر قابل ملاحظه‌ای بر روی کیست‌های ژیارديا نداشته است (با میانگین کشندگی ۷٪) (۱۷).

یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که می‌توان از عصاره هیدروالکلی و اسانس زنیان در درمان کیست‌های ژیارديا استفاده کرد. چون ژیارديا ابتدا بصورت کیست وارد بدن می‌شود و به صورت کیست نیز از طریق مدفعه از بدن دفع می‌گردد، مسلماً اثر کشندگی عصاره و اسانس زنیان برای جلوگیری از آلودگی و همین طور زمانی که این ماده به مقدار مناسب در معده و روده حضور داشته باشد، با کشتن کیست از پدیده Excystment و تبدیل آن به شکل تروفوزوئیتی و در نتیجه، استقرار بیماری جلوگیری می‌کند.

با توجه به اثر کشندگی اسانس و عصاره هیدروالکلی زنیان بر روی کیست‌های ژیارديای مورد استفاده در این تحقیق می‌توان گیاه زنیان را گیاهی مؤثر در از بین بردن کیست‌های ژیارديا در شرایط آزمایشگاهی معرفی کرده و جهت استفاده کلینیکی از اسانس و عصاره این گیاه انجام تحقیقات بیشتری همچون بررسی مواد شیمیایی مؤثر در اسانس و عصاره گیاه زنیان، بررسی اثر اسانس و عصاره گیاه زنیان روی تروفوزوئیت ژیارديا لامبیا، تغییرات حاصل از حرارت‌دادن اسانس و عصاره گیاه زنیان و ... را توصیه نمود.

تشکر و قدردانی

از اعضاي هيات علمي گروه انگلشناسي و قارچشناسي
دانشگاه پزشكى علوم پزشكى شهيد بهشتى و اساتيد

می نماییم.

REFERENCES

1. Mahbubani MH, Bej AH, Perlin MH, Schaefer III FW, Jakubowski W, Atlas RM. Differentiation of Giardia duodenalis from other SPP by using polymerase chain reaction a gene probes. *J Clinical Microbiol* 1992;30:74-78.
2. Mayrhofer G, Andrews RH, Ey PL, Chilton NB. Division of Giardia isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with Giardia muris. *Parasitol* 1995;111:11-17.
3. Lujan HD, Mowatt MR, Nash TE. The molecular mechanisms of Giardia Encystation. *Parasitol today* 1998;14:446-50.
4. Garcia, Lynne Shore. Diagnostic medical parasitology. ASM Press. 2001; pp. 36-49.
5. Schmidt, G.D., Roberts L.S. Foundation of parasitology. Mc Graw-Hill Book Co. 2000; pp. 83-88.
6. Saebi. Protozoal disease in Iran, Text book of clinical parasitology. 1998; pp.81-95.
7. Abdi YA, Gustafsson LL, Ericsson O, Hellgren U. Handbook of drugs for tropical parasitic infections. United Kingdom, London: Taylor & Francis Ltd.;1995, pp 12-16.
8. Craun GF. Waterborne outbreaks of giardiasis: current status. In S. L. Erlandsen, and E. A. Meyer (ed.). *Giardia and giardiasis: biology, pathogenesis, and epidemiology*. Plenum Press, New York, 1996, pp. 243-261.
9. جلال، جامی رودی، بررسی و شناسایی مواد موجود در انسان میوه و اندام هوایی گیاه carum copticum. پایان نامه ۵۰، ۱۳۷۶-۱۳۷۷.
10. زرگری، علی، گیاهان دارویی، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۷۲، ص ۳۰-۳۶.
11. Nagulakshmi S, Shankaracharya NB, Naik JP, Rao LJM. Studies on chemical and technological aspects of ajowan aspects (*Trachyspermum ammi*). *J food sci technol mysore* 2000;39:277-81.
12. Krishnamoorth V. mada lagevio MB. *Trachyspermum ammian* essential crop for north karnataka. *J medic aromatic plant sci* 1999;4:996-98.
13. Steveson F, Jonnison M, Peckie J, Townley L. Cattle manure as a Corps in zero and conventional tillage systems can. *J Plant sci* 1998;78:409-10.
14. Meyer, E. A. Isolation and axenic cultivation of Giardia trophozoites from the rabbit, chinchilla, and cat. *Exp Parasitol* 1970;27:179-83.
15. صمصام شریعت سید هادی. عصاره‌گیری و استخراج مواد مؤثره گیاهان دارویی و روش‌های شناسایی و ارزشیابی آنها. انتشارات مانی، ۱۳۷۱.
16. Hill, DR, Pohl R, Pearson RD. Giardia lamblia: a culture method for determining parasite viability. *Am J Trop Med Hyg* 1986;35:1129-33.
17. فرسنگی محمد حجت، صاحب‌الله نعمت‌الله، موحد علی. اثرات کشتندگی آویشن بر روی کیست ژیاردیا در شرایط آزمایشگاهی. طب جنوب، سال چهارم، شماره ۰۴؛ ۱۳۸۰: ۹۵-۸۸.