نشریه آموزشی- پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور

فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی

شماره ۲۲، بهـار ۱۳۹۶

ص‌ص: ۴۳~۵۲

بررسی اثر ضد کاندیدایی ادرار شتر، برعلیه سه گونه کاندیدای مقاوم به فلوکونازول

- **ریحانه امینی** (نویسنده مسئول)

دانش‌آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان

- **محمد ربانی**

دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اصفهان

- **پروین دهقان**

دانشیار، گروه قارچ‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

شماره تماس نویسنده مسئول: ۹۱۳۶۸۶۱۳۶۶۰

Email: reihaneh.amini66@gmail.com

چکیده:

در سال‌های اخیر، مقاومت‌های میکروبی در برابر آنتی بیوتیک‌ها در حال افزایش است و این امر به چالش بزرگی در آنتی بیوتیک درمانی تبدیل شده است. بر این اساس، تلاش‌های گسترده‌ای برای بهره‌گیری از ترکیبات طبیعی ضد میکربی جایگزین صورت گرفته است. ادرار شتر یکی از این ترکیبات است که خواص درمانی و ضدمیکروبی را دارا می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهند که استفاده از ادرار شتر به‌عنوان دارو پیشینه در طب سنتی به‌ویژه در جهان اسلام دارد و در احادیث نیز به آن اشاره شده است. اطلاعات موجود نشان می‌دهند، ادرار شتر فعالیت ضد میکروبی قوی علیه برخی پاتوژن های آلوده کننده انسان از جمله، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشریشیا کلای*، *کاندیدا آلبیکنس* و ... دارد. با توجه به گسترش خطر کاندیداهای مقاوم به دارو، در این مقاله اثر ضدکاندیدایی سه نمونه ادرار شتر علیه سه گونه کاندیدای مقاوم به فلوکونازول با دو روش میکروتیترپلیت و دیسک آگار انجام شد. نتایج نشان داد، ادرار شتر در برابر *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا گلابراتا* هاله عدم رشد ایجاد می‌کند (۱۲-۱۰ میلی‌متر)، در حالی که با روش میکروتیترپلیت، ادرار شتر تنها برای *کاندیدا آلبیکنس* دارای MIC50 است. در هر دو روش *کاندیدا کروزه‌ای* دارای مقاومت به اثر ضدکاندیدایی ادرار شتر بود .امید است با انجام مطالعات بیشتر در آینده بتوان از اثرات درمانی ادرار شتر برای پیشگیری، کنترل و درمان عفونت‌ها از جمله عفونت‌های کاندیدایی به‌خوبی بهره‌مند شد.

واژه‌های کلیدی: ادرار شتر، فلوکونازول، *کاندیدا آلبیکنس* ، *کاندیدا کروزه ای*، *کاندیدا گلابراتا*

Applied Animal Science Research Journal No 22 pp: 43-52

Study of Antifungal Effect of Camel Urine, Against Three Fluconazole Resistant Candida Species

By: R. Amini[1*] , M. Rabbani[2], P. Dehghan[3]
1 MSc graduate in Microbiology, University of Isfahan
2Associate Professor, Department of Biology, University of Isfahan
3Associate Professor, Department of Mycology, Isfahan University of Medical Sciences

In recently years, the increase in antibiotic resistant microbial diseases, has grown into an ever bigger challenge for antimicrobial therapy.Therefore, there are many efforts to replace or complete prevention or treatment with natural effective materials such as camel urine. It has valuable bioactive and antimicrobial factors. Studies have shown that the use of camel urine as a part of medicine in traditional medicine especially between Muslims and its beneficial effects have expressed in some Islamic texts.. Some available data indicate significant antimicrobial activities of camel urine against some pathogenic microbes such as *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Candida albicans.* The aim of this study was to investigate the antifungal effect of camel urine against three species of fluconazole-resistant *Candida* by microtiter plate and disk diffiusion agar methods. The results showed that camel urine in the face of *C. albicans* and *C. glabrata* have an inhibition zone (12-10 mm), While by microtiter plate method, camel urine has MIC50 only for *C.albicans*. In both methods, *C.krusei* expressed resistance to antifungal activity of camel urine.It is hoped that with further researchs in the future we can properly use the therapeutic effects of camel urine

Key words: Camel urine, *Candid albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, Fluconazole

مقدمه

ادرار شتر

ادرار در پستانداران توسط کلیه‌ها تولید می‌شود. ادرار شامل اوره، اسیدهای آمینه، کراتینین[1]، اسیدهای آلی، آمونیاک، توکسین[2] و نمک‌های معدنی است. همه‌ی این ترکیبات محلول در آب بوده و به‌راحتی دفع می‌شوند. استفاده پزشکی از ادرار قرن‌هاست که شناخته شده است (Ahamad, *et al.*, 2015) .

در سال‌های اخیر، بیماری‌های میکروبی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها در حال افزایش است که به چالش بزرگی در آنتی‌بیوتیک درمانی تبدیل شده است (Shinashal, 2014)، لذا رویکرد جدید، بازگشت به استفاده از مواد طبیعی مؤثر و کم ضرر است. از ۱۲۱ داروی مورد استفاده در درمان سرطان، ۹۰ عدد از آن‌ها از گونه-های گیاهی مشتق شده و ۷۴ درصد این داروها توسط بررسی فرهنگ عامه کشف شده است. در میان ترکیبات طبیعی در شبه‌جزیره عربستان که برای درمان‌های گوناگون استفاده می‌شود ادرار شتر به‌چشم می‌خورد (Al-Yousef, *et al.*, 2012). ادرار شتر هر دو ویژگی درمانی و ضدمیکروبی را دارا است. مطالعات نشان می‌دهند که استفاده از ادرار شتر به‌عنوان دارو و چگونگی استفاده از آن در آثار فقه و احادیث علمی جهان اسلام آورده شده است. در منطقه عرب‌نشین، مردم مواقعی موهایشان را با ادرار شتر شست‌وشو می‌کنند. ادرار شتر در کشورهای آسیایی برای درمان دیابت استفاده می‌شود. گرچه اطلاعات منتشر شده برای ادرار شتر اندک است ولی برخی گزارش‌ها حاکی از فعالیت ضدسرطانی و ضدپلاکت ادار شتر می‌دهد، فعالیتی که در ادرار انسان و گاو دیده نشده است (Ahamad, *et al.*, 201). ادرار شتر قسمتی از جنبش دارویی جایگزین است که ادرار درمانی

[1] Creatinine
[2] Toxins

نامیده شده است. ادرار شتر رنگ زرد تیره دودی و طعمی شبیه به علف شیرین دارد و به‌عنوان ماده مدر و فیبرینولیتیک[3] قابل استفاده است (Shinashal, 2014).

در رابطه با خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیکی و اثرات ضدمیکروبی ادرار شتر بر ضدمیکروب‌های آلوده کننده انسان و حیوانات اطلاعات بسیار کمی وجود دارد. اطلاعات در رابطه با خصوصیات ادرار شتر و فواید پزشکی آن هم محدوداست (Shinashal, 2014). اطلاعات موجود نشان می‌دهند که این ماده فعالیت ضدمیکروبی قوی علیه برخی پاتوژن‌های آلوده‌کننده انسان از جمله : *استافیلوکوکوس اورئوس*[4]، *سودوموناس آئروژینوزا*[5]، *اشریشیا کلای*[6] و ... دارد (Al-Bashan, M. 2011).

آوادی و همکاران (۲۰۱۴)، نیز گزارش دادند که ادرار شتر علیه *آسپرژیلوس نایجر*[7] و *کاندیدا آلبیکنس*[8] فعالیت ضدقارچی دارد (Al-Awadi, Al-Judaibi, 2014). دیگر مطالعات نیز فعالیت ضدقارچی ادرار شتر علیه *رایزوکتونیا سولانی*[9] و *فوزاریوم اگزیسپوروم*[10] را اثبات نموده است و به‌عنوان عامل ضدمیکروب مورد توجه قرار گرفته شده است (Kabbashi, Omer, 2016).

مقادیر متفاوتی از بعضی ترکیبات مانند کاناوانین[11]، اریتریتول[12]، بنزن[13]، پروپانوئیک اسید[14] و ملی‌بیوز[15] در ادرار شتر و گاو وجود دارد. به‌طور مثال، مقدار کاناوانین ادرار شتر ۲ درصد است که آنتی‌متابولیت سمی از ال-آرژنین[16] است و فعالیت ضدسرطانی قوی دارد. ملی‌بیوز، دی-گالاکتوز و ۲-دی‌اکسی گالاگتوپیرانوز محصولات جانبی گلیکولیز[17] هستند. بنزن پروپانوییک اسید هم یک اسید چرب فرعی با اثرات کامل آن هنوز ناشناخته است و ممکن است، مسئول فعالیت ضدپلاکتی ادرار شتر باشد. ترکیبات معدنی به جز سدیم، پتاسیم، آهن، منیزیم و کروم در ادرار شتر و گاو یکسان است و سطح سدیم و پتاسیم در ادرار شتر در مقایسه با ادرار گاو بسیار بالا است. دیگر یافته جالب، سطح منیزیم در ادرار شتر است که جزئی مهم از ATP است و نقش مهمی در سنتز DNA و RNA بازی می‌کند، هم‌چنین در بیش از ۳۰۰ واکنش آنزیمی به عنوان کوفاکتور شرکت می‌کند که برای عملکرد ساختاری پروتئین‌ها، نوکلئیک اسیدها و میتوکندری لازم است. یافته‌ها سطح بالای آهن را در ادرار شتر در مقایسه با ادرار گاو نشان می‌دهند. این فلز یک عامل ضروری برای فعالیت‌های هموگلوبین برای ظرفیت حمل اکسیژن است. آهن هم‌چنین بخش جدایی‌ناپذیر آنزیم‌هایی مثل سیتوکروم p450[18] می باشد(Ahamad, 2015).

متابولیت‌هایی از جمله کاناوانین که در ادرار است توسط سایر دام‌ها مانند گاو، گوسفند و بز دفع می‌شود، ولی درصد آن در مقایسه با ادرار شتر کمتر است. کاناوانین محصول جانبی متابولیسم اوره، اسیدآمینه‌ها و آنالوگ آرژنین است و فعالیت قوی علیه سلول‌های سرطانی نشان می‌دهد. علاوه بر این، بنزن پروپانوییک اسید ممکن است در فعالیت ضدپلاکتی ادرار شتر نقش داشته باشد (Ahamad, et al., 2015).

دلیل بوی بد و سمیت ادرار وجود امونیاک و اوره است که دفعیات شتر برخلاف دیگر حیوانات و انسان، آمونیاک ندارد و حاوی مقدار بسیار جزیی اوره است. تحقیقات بعدی نشان داده که ادرار شتر حاوی ۱۰ نمک معدنی بیشتر از ادرار انسان است. بنابراین برخلاف ادرار انسان که اسیدی است، ادرار شتر قلیایی با pH≥۷/۸ است (Al-Yousef, *et al.*, 2012).

اخیرا اثبات شده است که خاصیت ضدقارچی ادرار شتر پس از ۶ ماهه نگه‌داری و حرارت دادن تا ۱۰۰ درجه سلسیوس افزایش می‌یابد به‌گونه‌ای که قادر است به‌طور کامل رشد *کاندیدا آلبیکنس* را مهار کند، این امر می‌تواند به‌دلیل افزایش غلظت

---

[3] **fibrinolytic** فرآیند فیبرینولیتیک از توسعه‌ی لخته‌ی تشکیل شده در جریان خون جلوگیری می‌کند و با حذف فیبرین ایجاد شده در ناحیه‌ی آسیب‌دیده‌ی عروق جریان خون را برقرار می‌کند.

[4] *Staphylococcus aureus*

[5] *Pseudomonas aeruginosa*

[6] *Escherichia coli*

[7] *Aspergillus niger*

[8] *Candida albicans*

[9] *Rhizoctonia solani*

[10] *Fusarium oxysporum*

[11] Canavanine اسید آمینه غیرپروتئینی طبیعی

[12] Erythritol یک قند الکلی طبیعی

[13] Benzene

[14] propanoic acid

[15] Melibiose

[16] L_Arginine

[17] Glycolysis

[18] Cytochromes *P450* (CYPs) پروتئین‌هایی که در زنجیره انتقال الکترون و تشکیل ATP فعال است.

فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی

ترکیبات فعال در ادرار باشد، زیرا این فرآیندها منجر به لیز شدن سلول‌های باکتریایی داخل ادرار و ترشح آنزیم‌های ترشحی و آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود (Al-Awadi, Al-Judaibi, 2014). مطالعات دیگری نشان‌دهنده وجود ترکیبات پیچیده بیواکتیو در ادرار شتر می‌باشد که می‌تواند علیه باکتری، قارچ، ویروس، انگل‌ها و عوامل سرطان‌زا عمل‌کرد داشته باشد و قادر به حفاظت کبد علیه مواد سمی است (Salwa, *et al.*, 2013).

گفته می‌شود که ممکن است نوع تغذیه شتر در آثار درمانی فرآورده‌های آن مؤثر باشد. چنان‌چه اظهار شده، شترهای کویری از که افسنطین تغذیه می‌کنند که گیاهی است به‌طور فوق‌العاده برای بهبود اختلالات گوارشی و کمک به سم‌زدایی از کبد مفید است و برای درمان هپاتیت استفاده می‌شود، دارای اثر مؤثرتری می‌باشد (Al-Bashan, 2011).

معرفی کاندیدا یا قارچ‌های مخمر

کاندیدا از قارچ‌های مخمری مهم انسان و حیوانات است. *کاندیدا آلبیکنس* یک قارچ دو شکلی است که می‌تواند به دو شکل جوانه‌دار و رشته‌ای رشد کند. کاندیداآلبیکنس می‌تواند در دمای ۳۷ درجه، در بافت زنده (اپی‌تلیال) رشد کند و در افراد مبتلا به اختلال سیستم ایمنی، سبب عفونت‌های سیستمیک شود. میزان مرگ‌ومیر در اثر این عفونت ۳۰ درصد است (Tang, Jiong and Jing, 2012). اگرچه *کاندیدا آلبیکنس* شایع‌ترین عامل کاندیدیازیس هست ولی گونه‌های دیگر متعلق به جنس کاندیدا از جمله *گلابراتا*[19]، *کروزه‌ای*[20]، *پاراپسیلوزیس*[21]، *تروپیکالیس*[22]، *گیلرموندی*[23] و ... نیز کم و بیش از بیماران جدا می‌شوند. اهمیت گونه‌های غیر*آلبیکنس* در سال‌های اخیر به‌واسطه بروز مقاومت نسبی در بعضی از این گونه‌ها مثل *گلابراتا* و *کروزه‌ای* نسبت به برخی از داروهای ضدقارچی زیادتر شده است (میرهندی و همکاران، ۱۳۸۵) .

کاندیدا گلابراتا اغلب به‌عنوان دومین یا سومین عامل کاندیدیازیس پس از *آلبیکنس* است. عفونت‌های حاصل از *گلابراتا* به‌صورت عمومی(سیستمیک) یا مخاطی است و در میزبان‌های غیرطبیعی مثل اشخاصی با ایمنی سرکوب شده یا مبتلا به دیابت‌ملیتوس[24] وجود دارد. عفونت‌های *گلابراتا* غالباً سخت درمان می‌شود و مقاوم به اغلب آزول‌ها مخصوصاً فلوکونازول هستند، به‌همین دلیل مرگ‌ومیر بالایی در بیمارانی با ایمنی سرکوب شده و بستری شده در بیمارستان به‌دنبال دارند(Fidel, Vazquez and Sobel, 1999).

کاندیدا کروزه‌ای به‌دلیل مقاومت ذاتی آن به فلوکونازول و کاهش حساسیت به فلوسیتوزین و آمفوتریسین B دارای مقاومت چند دارویی[25] است (Pfaller, Diekema and Gibbs, 2010).

داروی ضدقارچی فلوکونازول

از داروهای مهم ضدقارچی فلوکونازول است. هرچند اثرات سوء مربوط به فلوکونازول درمانی شامل تهوع، سردرد، راش‌های پوستی (ضایعه پوستی جوش یا دانه)، درد شکم، استفراغ و سمیت کبدی به‌ندرت گزارش شده است. در سال‌های اخیر مقاومت نسبت به این دارو به‌طور فزاینده گزارش شده است. این عقیده وجود دارد که سویه‌های مقاوم پیامد قرار گرفتن در معرض داروهای ضدقارچی هستند (تقی‌زاده ارمکی، ۱۳۹۱) .

با توجه به آن‌چه مطرح شد، شایسته است در رابطه با اثرات شگفت انگیز ادرار شتر، مخصوصا اثرات ضد میکروبی آن، با توجه به افزایش روزافزون سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک، تحقیقات بیشتری انجام شود تا شاید بتوان با استفاده مستقیم یا استخراج ترکیبات خاص آن، به داروهایی موثر علیه عفونت‌های میکروبی مقاوم به آنتی بیوتیک دست یافت .مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اولیه از تاثیر ضد کاندیدایی ادرار شتر صورت گرفته است.

---

[19] *C. glabrata*
[20] *C. krusei*
[21] *C. parapsilosis*
[22] *C. tropicalis*
[23] *C. guilliermondii*

[24] دیابت ملیتوس Diabetes mellitus (DM) (دیابت شیرین: از دسته بیماری‌های متابولیستی است که در آن هورمون انسولین به‌صورت ناقص ترشح می‌شود یا اصلاً ترشح نمی‌شود که حداکثر شیوع آن در اوایل دوران بلوغ می‌باشد.

[25] Multi drug resistance (MDR)

مواد و روش‌ها

تهیه سویه‌های مخمر کاندیدا

سویه‌های مخمر کاندیدا از بخش قارچ شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان دریافت شدند. سویه‌های دریافتی که از واژن جداسازی شده و به داروی ضدقارچ فلوکونازول مقاوم هستند با کیت تجاری API 20C تعیین گونه شده‌اند، اساس این آزمایش بر قدرت مخمر در جذب ترکیبات کربنی است که بر اساس تفاوت‌های موجود در گونه‌های مختلف مخمر، می‌توان مخمرهای جدا شده از بیماران را تعیین هویت نمود.

تهیه ادرار شتر

سه نمونه ادرار شتر از منطقه ورامین تهران در ظروف استریل جمع‌آوری و تا زمان استفاده در یخچال نگه‌داری شدند.

تعیین مقاومت یا حساسیت سویه‌های کاندیدا به ماده ضدقارچی فلوکونازول

ابتدا برطبق فرمول زیر استوکی از داروی ضد قارچی فلوکونازول تهیه می‌کنیم :

$$\frac{\text{Target Volum (mL)} \times \text{Concentration}(\mu g/ml)}{\text{Assay Potency } (\mu g/mg)} = \text{Weight (mg)}$$

استوک تهیه شده با فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲ میکرون استریل شده و در دمای ۲۰- تا ۶۰- نگه‌داری شد. غلظت‌های نهایی فلوکونازول ۶۴-۰/۱۲۵ میکروگرم/میلی‌لیتر بود، بنابراین یک‌سری از رقت‌های فلوکونازول به‌صورت ۱۰X در DMSO (حلال فلوکونازول) تهیه شد. سپس هر رقت به‌صورت ۵ : ۱ در محیط RPMI (با گلوتامین، بدون بی‌کربنات و حاوی فنول‌رد به عنوان اندیکاتور pH رقیق گردید تا به غلظت دو برابر موردنیاز رسیدیم، در نهایت ماده با ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون مخمر تا رسیدن به غلظت نهایی موردنظر (جدول۱) مخلوط شد (Standards NCfCL, 2002).

جدول ۱- غلظت فلوکونازول در هر رقت

رقت فلوکونازول	غلظت (میکروگرم/میلی‌لیتر)
۱	۶۴
۲	۳۲
۳	۱۶
۴	۸
۵	۴
۶	۲
۷	۱
۸	۰/۵
۹	۰/۲۵
۱۰	۰/۱۲۵

آماده‌سازی استوک مخمر

تقریباً یک میلی‌متر از کلنی را در ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل ۸۵ درصد حل کرده، سپس ۱۵ ثانیه ورتکس می‌کنیم، سپس با اسپکتروفتومتر کدورت را به ۰/۵ مک فارلند می‌رسانیم ($۱-۵ \times ۱۰^{۶}$ cell/ml). در مرحله بعد استوک بالا را به‌صورت ۵۰ :۱ در سرم فیزیولوژی رقیق کرده، سپس مجدداً به‌صورت ۲۰ :۱ در RPMI رقیق می‌کنیم که در نهایت تعداد سلول ها برابر $۱-۵ \times ۱۰^{۳}$ می‌شود. این رقت به‌صورت ۱:۱ با غلظت موردنظر داروی فلوکونازول مخلوط می‌شود که غلظت نهایی مخمر $۰/۵ - ۲/۵ \times ۱۰^{۳}$ می‌شود (جدول ۲).

در نهایت پلیت ۹۶ خانه‌ای به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۵^{0C} انکوبه شده و پس از آن جذب چاهک‌ها توسط الایزاریدر با طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده می‌شود (Standards NCfCL, 2002) .

تعیین هاله‌ی عدم رشد کاندیدا در حضور ادرار شتر به‌روش دیسک آگار

ابتدا کدورت ۰/۵ مک فارلند از سویه کاندیدا در سرم فیزیولوژی استریل تهیه و به صورت چمنی با سوآب بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد، سپس دیسک‌های استریل آغشته به ادرار شتر را به آرامی بر روی محیط قرار داده و پس از یک ساعت قرار گرفتن در محیط، به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور $۳۷^{\circ C}$ انکوبه و سپس هاله‌ی عدم رشد اندازه‌گیری شد (Ameri, 2015).

تعیین MIC ادرار شتر

همان‌طور که جدول ۳ نشان می‌دهد، ۸ رقت متوالی از ادرار شتر به‌صورت ۱:۱ در بافر فسفات نمکی (PBS) تهیه شد (به‌گونه‌ای که رقت۱، ۰/۵ و رقت ۸، ۰/۰۰۳۹ در نظر گرفته شود) و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت با ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون مخمر با کدورت نیم مک‌فارلند (۱×۱۰^{۶}CFU/ml) در هر چاهک مخلوط و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در انکوباتور ۳۷^{0C}، کدورت چاهک‌ها توسط الایزا ریدر خوانده شود (Kabbashi and Omer, 2016).

جدول ۲- محتویات چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای برای بررسی تعیین MIC فلوکونازول (میکرولیتر) *

	چاهک‌های آزمایش	کنترل منفی	کنترل مثبت	شاهد کدورت
سویه کاندیدا	۱۰۰	-	۱۰۰	-
رقت مورد نظر از فلوکونازول	۱۰۰	-	-	۱۰۰
محیط RPMI	-	۱۰۰	۱۰۰	-
محیط YPD	-	۱۰۰	-	۱۰۰

*: کدورت سویه کاندیدا و رقت فلوکونازول در محیط RPMI تهیه شده

جدول ۳- محتویات چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای برای بررسی اثر ضدکاندیدایی ادرار شتر (میکرولیتر)

	چاهک های آزمایش	کنترل منفی	کنترل مثبت	شاهد کدورت
سویه کاندیدا	۱۰۰		۱۰۰	
رقت مورد نظر از ادرار شتر	۱۰۰			۱۰۰
*PBS		۱۰۰	۱۰۰	
محیط YPD**		۱۰۰		۱۰۰

*: کدورت سویه کاندیدا در YPD تهیه شده **: رقت ادرار شتر در PBS تهیه شده

نتایج و بحث

تایید مقاوم بودن سه گونه مخمر به فلوکونازول

بر طبق استاندارد CLSI مقاومت گونه‌های مخمر به‌روش میکروتیتر پلیت تایید شد و برای اطمینان از صحت انجام آزمایش، با یک گونه *کاندیدا آلبیکنس* حساس به فلوکونازول مقایسه شد (جدول ۴ و نمودار ۱).

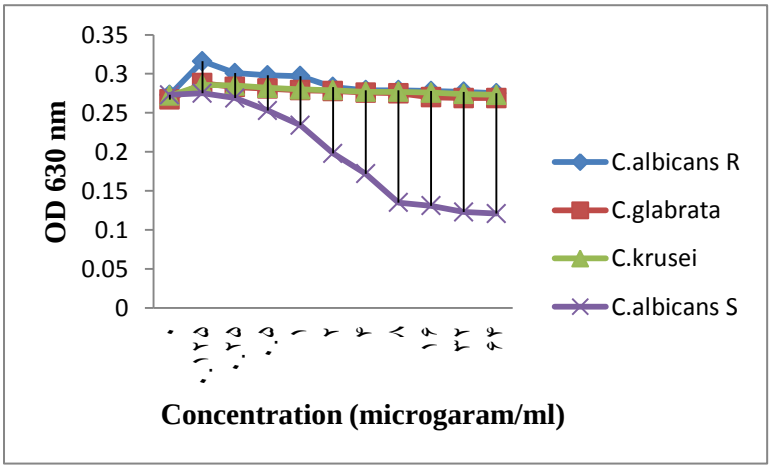
جدول ٤- نتایج حاصل از انجام میکروتیتر پلیت برای بررسی اثر ضدکاندیدایی فلوکونازول

گونه کاندیدا	MIC_{50} بر اساس غلظت فلوکونازول بر حسب (µg/ml)
C.albicans مقاوم	≤۶۴
C.glabrata مقاوم	≤۶۴
C.krusei مقاوم	≤۶۴
C.albicans حساس	≥۸

$MIC_{50} \leq 8$ µg/ml : گونه حساس (S)

MIC_{50} : 16 -32 µg/ml : گونه حساس وابسته به دوز (DD-S)

$MIC_{50} \geq 67$ µg/ml : گونه مقاوم (R) (Standards NCfCL, 2002).



نمودار ۱ : نمودار مقایسه‌ای تاثیر فلوکونازول بر مهار رشد ٤ گونه مخمر

نتایج حاصل از انجام میکروتیتر پلیت برای بررسی اثر ضدکاندیدایی ادرار شتر

انجام میکروتیتر پلیت با استفاده از ادرار شتر حاکی از آن است که MIC_{50} ادرار شتر علیه گونه *کاندیدا آلبیکنس* برابر با رقت ۰/۵ است و علیه گونه‌های *کاندیدا گلابراتا* و *کروزه ای* فاقد MIC_{50} است (جدول ۵).

جدول ۵- نتایج MIC ادرار شتر به روش میکروتیتر پلیت

گونه کاندیدا	**MIC_{50}** برحسب غلظت ادرار شتر
C.albicans	۰/۵
C.glabrata	–
C.krusei	–

هاله‌ی مهاری اندازه‌گیری شده پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون پلیت ها در ۳۷ درجه سلیسیوس در جدول ۶ مشخص شده است.

جدول ٦- قطر (میلی‌متر) هاله عدم رشد کاندیدا با قرار گرفتن در معرض ادرار شتر

نمونه ادرار / مخمر	نمونه ۱	نمونه ۲	نمونه ۳
کاندیدا آلبیکنس	۱۲	۱۲	۱۲
کاندیدا گلابراتا	۱۰	۱۰	۱۰
کاندیدا کروزه‌ای	۰	۰	۰

با توجه به نتایج به‌دست آمده، مقاومت گونه‌های کاندیدا به فلوکونازول به‌روش میکروتیتر پلیت تایید شد و جهت سایر آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

همان گونه که مشاهده می‌شود، ۳ نمونه ادرار دارای نتایج یکسان بودند و این می‌تواند به این دلیل باشد که هر سه نمونه از شترهای یک منطقه با تغذیه مشابه بوده‌اند، بنابراین ترکیبات تشکیل‌دهنده ادرار و حتی pH آن نیز مشابه می‌باشد. در پژوهشی که توسط الاوادی و الجودیبی (۲۰۱۴) انجام گرفت، مشخص شد ادرار شتر علیه *کاندیدا آلبیکنس* دارای فعالیت ضدقارچی است و دلیل آن را قلیایی بودن ادرار شتر با توجه به غلظت بالای پتاسیم، منیزیم و کلسیم ادرار و پروتئین و غلظت پایین کربوهیدرات و سلولز بیان نمودند(Al-Awadi, Al-Judaibi, 2014).

همان گونه که اشاره شد، در هر دو روش نمونه ادرار شتر برای کاندیدا کروزه‌ای فاقد هاله عدم رشد و MIC50 *کاندیدا کروزه‌ای* دارای مقاومت ذاتی به فلوکونازول است و به‌همین ترتیب به سایر مواد ضدقارچی، اعم از طبیعی یا سنتتیک واکنش

کمتری نشان می‌دهد که با نتایج سایر محققین تایید شده است (Svenson, Morris and Srikantha, 2002).

با توجه به افزایش روز افزون فراوانی کاندیداهای مقاوم به فلوکونازول و عوارض جانبی این داروها و همچنین افزایش بیماران در معرض ابتلا به کاندیدیازیس، می‌توان جهت پیشگیری و درمان از موادی با منشاء طبیعی استفاده نمود که هم عوارض جانبی کمتری را به‌جای می‌گذارند و هم ارزان‌تر و در دسترس-ترند. نتایجی که در این پژوهش به‌دست آمد مؤید این نکته است که ادرار شتر قادر به مهار حداقل برخی کاندیداهای رایج است. ذکر این نکته ضروری است که نتایج به دست آمده، برای گونه‌های کاندیدایی مقاوم به فلوکونازول بود و بعید نیست که در صورت استفاده علیه گونه‌های حساس اثرات ضدکاندیدایی قوی‌تری را شاهد باشیم.

تشکر و قدردانی

در این جا لازم است، از زحمات آقای دکتر حسین اسماعیلی، عضو هیات علمی دانشگاه تهران که در تهیه نمونه‌ها به ما کمک کردند و مسئولین آزمایشگاه پژوهشی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان که در انجام این پروژه مساعدت نمودند، تشکر نماییم.

منابع

۱. تقی‌زاده ارمکی، م. (۱۳۹۱). قارچ‌شناسی، انتشارات کتاب ارجمند، تهران. ۲۹-۲۷.

۲. میرهندی، س. ماکی‌مورا، ک. شیدفر، م، حسین‌پور، ل. (۱۳۸۵). شناسایی و تعیین فراوانی گونه‌های *کاندیدا* جدا شده از بیماران به‌روش کروم آگار کاندیدا. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان ۴۲: ۴-۱۳.

3. Ahamad, S. R., Alhaider, A. Q. Raish, M. and Shakeel, F. (2015). Metabolomic and elemental analysis of camel and bovine urine by GC–MS and ICP–MS. Saudi Journal of Biological Sciences, 1319 (562X): 1- 6.

4. A-Ameri, G., Alkolaibe, A. Al-kadassy, A. Alkadasi, M. and Zaide, A. (2015). Determination the efficiency of camel's urine against multi-drugs resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRPA), isolated from effected burns, wounds and ears. Asian Journal Pharmacy Resarch, 5(1): 1-9.

5. Al-Awadi, A., Al-Judaibi, A. (2014) Effects of heating and storage on the antifungal activity of camel urine. Clin Microbiol , 3:2

6. Al-Bashan, M. (2011). In vitro assessment of the antimicrobial activity and biochemical properties of camel's urine against some human pathogenic microbes. Middle-East Journal of Scientific Research, 7(6): 947-958

7. Al-Yousef, N., Gaafar, A. Al-Otaibi, B. Al-Jammaz, I. Al-Hussein, Kh. and Aboussekhra, A. (2012). Camel urine components display anti-cancer properties in vitro. Journal of Ethnopharmacology, 143: 819-825

8. Fidel, P. L., Vazquez, J. A. and Sobel, J. D. (1999) Candida glabrata: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. Clinical Microbiology Reviews, 12:80-96

9. Kabbashi, M., Omer, A. (2016). In vitro antifungal activity of camel's urine against dermatophytes. American Journal of Research Communication, 4(4): 183-191

10. Pfaller, M., Diekema, D. Gibbs, D. *et al*. (2010) Results from the artemis disk global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of Candida species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. Journal of Clinical Microbiology, 48:1366-1377

11. Salwa, M., Khogli, E. Samia, H. Rahman, A. Esraa, M. Musa, M. and Hassan, E. (2013). Gas chromatography mass spectophotometry (GC-MS) analysis of female camel urine extracts. Journal Veterinary Med4dicine and Animal Production, 4(1): 50-60.

12. Shinashal, R. Z. (2014).The Capability of camels urine in the treatment of infection caused by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Journal of College of Education for Pure Sciences, 4(1) : 335
13. Standards NCfCL. (2002). Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast: approved standar. National Committee for Clinical Laboratory Standards.
14. Svenson, A., Morris, R. Srikantha, R. *et al.* (2002). Antimicrobial effects of vinegar on *Candida Species.* Journal of Dental Research. Int Amer Assoc Dental Researchi Adr/Aadr 1619 Duke ST, Alexandria, VA 22314-3406 USA, pp. A285-A285
15. Tang, H. Jiong, R. and Jing, Y. (2012). An in vitro assessment of inhibitory effect of 16 strains of probiotics on the germination of *Candida albicans*. African Journal of Microbiol Research, 4:1252-1256