نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی
دوره نوزدهم، شماره اول، بهارو تابستان ۱۴۰۲،
پیاپی ۴۶ :۲۵-۱۰

JVM Journal of Veterinary Microbiology

مقاله پژوهشی

بررسی اثر داروی گیاهی تیماسین پلاس® بر عفونت تجربی خوراکی سالمونلا تیفی موریوم در جوجه های گوشتی

زهرا داودی[۱]، حمید استاجی*[۲]، سحر غفاری‌خلیق[۳]، سیدحسام‌الدین عمادی‌چاشمی[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

۲- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

۳- استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

۴- استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۱۸

چکیده

سالمونلا تیفی‌موریوم یکی از مهمترین و بیماریزاترین *سالمونلاها* بوده که منجر به آلودگی در انسان، دام و طیور می‌شوند و کاهش تولید و متعاقبا خسارات اقتصادی فراوانی در صنعت طیور به همراه دارد. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در جهت کاهش عوارض و از بین بردن باکتری‌ها در دوزهای مختلف، منجر به ایجاد مقاومت می‌شود. در گیاهان، خاصیت ضدمیکروبی، بطور ذاتی در عناصر سازنده وجود دارد، بنابراین در بدن انباشته نشده و اثرات جانبی آنتی‌بیوتیک‌ها، نظیرمقاومت آنتی‌بیوتیکی، واکنش آلرژیک، مشکلات معده و... به بار نمی‌آورند. پژوهش حاضر به منظور بررسی اثر ضدمیکروبی داروی گیاهی تیماسین‌پلاس® و اثر هم‌افزایی این دارو با آنتی‌بیوتیک اریترومایسین بر عفونت *سالمونلا تیفی‌موریوم* در جوجه‌های گوشتی یک روزه نژاد رأس ۳۰۸، انجام گرفت. بدین منظور از ۴۰ قطعه جوجه یک روزه نژاد رأس ۳۰۸ در چهار گروه ده‌تایی، استفاده گردید. مقدار ۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی 10^6 CFU باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* با سوند معدی به روش گاواژ چینه‌دان به تمام جوجه‌ها، به طور تجربی القاء شد. تیمارهای آزمایشی شامل کنترل منفی (القای عفونت ولی بدون مداخلات درمانی)، درمان با اریترومایسین، درمان با تیماسین‌پلاس® (حاوی عصاره آویشن‌باغی (*Thymus vulgaris*) و ختمی (*Althea officinalis*)) و درمان با ترکیب اریترومایسین و تیماسین‌پلاس®، بود. درمان از ۲۴ ساعت پس از القای عفونت آغاز و تا یک روز قبل از نمونه‌گیری ادامه داشت. در روزهای چهار و دوازده، بعد از مرگ با ترحم، بافت کبد و طحال جداسازی و برای بررسی‌های میکروبی شامل شمارش کلونی و تست Real-time PCR و آسیب‌های بافتی، مورد آزمایش، قرار گرفت. نتایج حاصل از تست Real-time PCR و شمارش کلونی ثابت کرد، شربت تیماسین‌پلاس® دارای اثر ضدمیکروبی بر روی باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* است. در این بررسی بیشترین میزان باکتری مختص گروه کنترل و کمترین مقدار مربوط به گروه درمان با اریترومایسین و تیماسین‌پلاس®، بود؛ همچنین در مطالعه نتایج هیستوپاتولوژی بافت کبد و طحال، اختلاف معنی‌داری میان گروه کنترل با سایر گروه‌ها مشاهده شد. از این مطالعه نتیجه گیری شد داروی گیاهی تیماسین‌پلاس عملکردی مشابه با اریترومایسین دارد و به‌صورت هم‌افزایی با اریترومایسین در کاهش جمعیت باکتری *سالمونلاتیفی‌موریوم* موثر می‌باشد. با توجه به پدیده مقاومت آنتی‌بیوتیکی، بهتر است به جای استفاده از مواد شیمیایی، از داروهای گیاهی و یا ترکیب داروی گیاهی و آنتی‌بیوتیک، استفاده شود.

کلمات کلیدی: *سالمونلا تیفی‌موریوم*، شربت تیماسین‌پلاس®، Real-time PCR، آویشن باغی، ختمی.

*نویسنده مسئول : حمید استاجی

آدرس: .گروه پاتوبیولوژی،دانشکده دامپزشکی،دانشگاه سمنان،سمنان،ایران .

پست الکترونیکی: hstaji@semnan.ac.ir

مقدمه

به بیماری‌ها و عفونت‌هایی که به طور طبیعی بین مهره‌داران درحال انتقال است، زئونوز می‌گویند. از دلایل اهمیت توجه به زئونوزها می‌توان به علل مرگ و میر در انسان و حیوانات و ایجاد خسارات اقتصادی قابل توجه در صورت وخامت شرایط، اشاره کرد (Wu Y, Luo L, Wang Y, Chen X, Mo D, Xie L, 2023). *سالمونلا تیفی‌موریوم* میکروارگانیسم درون سلولی اختیاری با باسیل‌های گرم منفی، فاقد اسپور در اندازه بین ۲ تا ۵ میکرومتر و قطر ۰/۷ تا ۲/۵ میکرومتر به صورت منفرد، زنجیره‌ی دوتایی و یا چندتایی که قادر به تولید سولفید هیدروژن است و منجر به بیماری‌زایی یا کلونیزه در انسان و حیوانات می‌شود (Javan J, Staji, H., Ghazvinian, K., Javaheri Vayeghan, A., Salimi, M. R., Mahdavi, 2012; Marchello CS, Birkhold M, Crump JA, Martin LB, Ansah MO, Breghi G, Canals R, Fiorino F, Gordon MA, Kim JH, 2022). اعضای این جنس، معمولاً از راه دهان وارد دستگاه گوارش می‌شود. علائم عمومی این عفونت شامل اسهال، استفراغ، دل‌درد و تب می‌باشد که نهایتا ۳ تا ۵ بعد از ورود به بدن، ظاهر می‌شود. سروتیپ تهاجمی غیرتیفوئیدی *سالمونلا* به اصطلاح iNTS (invasive Non-Typhoidal *Salmonella*) می‌باشد (Álvarez-Ordóñez A, Begley M, Prieto M, Messens W, López M, Bernardo A, 2011; Galán JE, 2021). بدن برای مقابله با *سالمونلا* و کاهش عوارض درگیری، به پاسخ ایمنی هومورال و سلولی نیاز دارد. عفونت‌زایی *سالمونلا*، با اتصال پیلی باکتری به سلول‌های انتروسیت (سلول‌های M لایه اپی‌تلیال) روده آغاز می‌شود. به محض رسیدن میکروارگانیسم به سطح اپی‌تلیوم، پرزهای حاشیه مسواکی روده (Brush border) تخریب شده و بعد از آزاد شدن باکتری به درون سلول، توسط فرورفتگی غشاهای سیتوپلاسمی در برگرفته می‌شوند (اندوسیتوز) و به لامینا پروپریا می‌رسند و به دیگر نقاط بدن منتشر می‌شوند (Balasubramanian D, López-Pérez M, Grant TA, Ogbunugafor CB, 2022; Xiong L, Wang S, Dean JW, Oliff KN, Jobin C, Curtiss III R, 2022).

میزان دز عفونی در گونه‌های *سالمونلا* با یکدیگر متفاوت است. برای ایجاد عفونت *سالمونلایی* باید میزان باکتری به گونه‌ای باشد که بتواند بر اسیدیته معده غلبه کرده و در رقابت با فلور طبیعی روده پیروز شود. به طور کلی، حدود 10^6 CFU باکتری برای ایجاد عفونت ضروری است. در شرایط خاص مثلا کاهش اسیدیته معده، افزایش سن و یا استفاده از آنتی‌اسیدها، میزان این دوز به 10^3 کاهش می‌یابد (Wibisono FM, Wibison FJ, Effendi MH, Plumeriastuti H, Hidayatullah AR, Hartadi EB, 2020). بیماری‌زایی *سالمونلا* در طیور؛ به نژاد، سن، قدرت تهاجمی و توانایی باکتری در زنده ماندن در برابر ایمنی ذاتی و تکثیر داخل سلول بستگی دارد. اندام‌های درگیر در عفونت *سالمونلایی* شامل ریه‌ها، میوکارد، پریکارد، تخمدان، مجرای تخم‌بر، سنگدان و کیسه زرده می‌باشد (Jibril AH, Okeke IN, Dalsgaard A, Menéndez VG, 2021; El-Saadony MT, Salem HM, El-Tahan AM, Abd El-Mageed TA, Soliman SM, Khafaga AF, Swelum AA, Ahmed AE, Alshammari FA, 2022). علائم جوجه‌های درگیر با *سالمونلا تیفی‌موریوم*، شامل: کندی رشد، بی‌حالی و خواب‌آلودگی، بال و پرهای آشفته و آویزان، تاج رنگ پریده و چروکیده، ضایعه‌های گچی اطراف مخرج، آسیب‌های چشمی، خس خس سینه، کاهش قابلیت باروری و تخم‌گذاری، اسهال و دهیدراسیون می‌باشد (Hossain MJ, Attia Y, Ballah FM, Islam MS, Sobur MA, Islam MA, Ievy S, Rahman A, Nishiyama A, Islam MS, 2021;

Hao G, Li P, Huang J, Cui K, Liang L, Lin F, Lu Z, 2023).

استفاده نادرست از آنتی‌بیوتیک‌ها، از جمله استفاده از آنها در سیستم‌های تولید دام به عنوان محرک رشد و استفاده بیش از حد از آنها در درمان‌های بالینی، به یک نگرانی بزرگ تبدیل شده است. بعد از شیوع یک بیماری در جامعه، به منظور کاهش عوارض و از بین بردن باکتری، از طیف گسترده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها در دزهای مختلف استفاده می‌شود؛ این اقدام به مرور زمان، تغییراتی در ساختار ژنتیکی باکتری به وجود می‌آورد که منجر به بروز مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک می‌شود. این اتفاق، قابل انتقال به نسل‌های بعد می‌باشد زیرا بسیاری از سالمونلاهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک از طریق مصرف مواد غذایی آلوده با منشاء حیوانی وارد بدن انسان‌ها می‌شود و به خطر انداختن سلامت عمومی و افزایش هزینه‌های مراقبت‌های بهداشتی را به همراه دارند. مقاومت گسترده گونه‌های مختلف باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها به عامل مرگ و میر صدها هزار نفر در سال مبدل شده است. افزایش مداوم تعداد باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های رایج و سرعت انتشار ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سرتاسر جهان، این نگرانی را تایید می کند (۱۳،۱۲). دانشمندان پیش‌بینی کرده‌اند که پاتوژن‌های مقاوم آنتی‌بیوتیک‌ها تا سال ۲۰۵۰ مسئول ۱۰ میلیون مرگ در سراسر جهان خواهند بود (Marquardt, R.R. and Li, 2018). به تازگی سویه‌های خاصی از باکتری‌های مقاوم به بتالاکتامازها و یا AmpC بتالاکتامازها از محصولات غذایی حیوانی جدا و شناسایی شده‌اند. علاوه بر این طیف گسترده‌ای از مقاومت در برابر داروهای ضدمیکروبی مانند سفالوسپورین‌های نسل سوم و چهارم، کاربا‌پنم‌ها، گلیکوپپتیدها و تیگسایکلین، باعث استفاده محدود از این داروها در پزشکی و دامپزشکی شده است. به همین دلیل مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های سالمونلا و کلون‌های بدخیم می‌توانند درمان عفونت و کنترل بیماری در انسان را دشوار کند و یک خطر جدی برای سلامت عمومی جهانی باشد (۱۵،۱۶). بنابراین سازمان بهداشت جهانی عنوان کرد، سالمونلا یک پاتوژن الویت‌دار است و هدف اصلی ترویج تحقیق و توسعه آنتی‌بیوتیک‌های جدید و یا جایگزینی روش یا ماده جدید بجای آنتی‌بیوتیک برای درمان آن است (۱۷،۱۸) با توجه به عوارض و سمیت بی‌شمار داروهای شیمیایی، هزینه‌های بالای سنتز و خرید، تمایل به جایگزینی و استفاده از داروهای گیاهی، روز به روز گسترش پیدا می‌کند و از آنجایی که خاصیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی، موجود در عناصر سازنده، در داروهای گیاهی به صورت ذاتی می‌باشد، این مواد با یکدیگر در تعادل بیولوژیک هستند بنابراین در بدن انباشته نشده و اثرات جانبی خاصی به بار نمی‌آورند (Xu Z, Dong M, Yin S, Dong J, Zhang M, Tian R, Min W, Zeng L, Qiao H, 2023). شربت تیماسین‌پلاس®، ساخت شرکت مدین فارما، برای تسکین سرفه، درمان برونشیت، خلط آور و برطرف کننده التهاب مجاری تنفسی، استفاده می‌شود. در هر ۵ میلی‌لیتر از این شربت، مقدار ۴۰۰ میلی‌گرم عصاره آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) و ۲۷۶ میلی‌گرم عصاره ختمی (*Althea officinalis*) وجود دارد. تیمول و کارواکرول دو جز اصلی موجود در آویشن با اثر هم افزایی و ایجاد کمپلکس با پروتئین‌های غشاء باکتری، فعالیت ضد باکتری خود را اعمال کرده (Antih J, Houdkova M, Urbanova K, 2021) همچنین کارواکرول، قادر به مهار تجمع پلاکتی و تعدیل مسیرهای سیگنالینگ در درگیری‌های التهابی و پرولیفراسیون سلولی می‌باشد

(Kaeidi A, Rahmani M, 2020)، خواص عصاره آویشن در کنار اثرات محافظتی و پانسمان کننده عصاره ریشه ختمی (Mahboubi M, 2020) و درمان بیماری‌های معده و روده با وجود منابع مهم موسیلاژ، موجود در انتهای ریشه ختمی (Zareii B, Seyfi T, Movahedi R, Cheraghi J, 2014)، مانع از تبدیل التهاب به یک عفونت باکتریال می‌شود.

هدف از این مطالعه، استفاده از یک داروی گیاهی تجاری برای درمان عفونت *سالمونلا تیفی‌موریوم* موجود در جوجه‌های گوشتی آلوده، است. از این شربت به طور معمول برای درمان سرفه و استفاده می‌شود ولی با مطالعه خاصیت ضدمیکروبی دو جز سازنده این شربت (آویشن باغی و ختمی)، از بین بردن عفونت *سالمونلا*یی دور از انتظار نیست.

مواد و روش کار

در این پژوهش، از ۴۰ قطعه جوجه گوشتی یک روزه رأس ۳۰۸، مخلوط از هر دو جنس با وزن تقریبی ۱۰۰ گرم، در قالب طرح کاملا تصادفی، در چهار گروه، استفاده گردید. چهار تیمار آزمایشی شامل کنترل منفی (القای عفونت ولی بدون مداخله دارویی)، درمان با آنتی‌بیوتیک اریترومایسین با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن جوجه، درمان با شربت تیماسین‌پلاس® با دوز ۵۰ میکرولیتر و درمان با آنتی‌بیوتیک اریترومایسین و شربت تیماسین‌پلاس®، بود (Owuama CI, 2017; Gerivani B,Staji H, Rassouli M, Ghazaleh N, 2020). درمان در این گروه‌ها از یک روز بعد از القای عفونت شروع و تا یک روز قبل از نمونه‌برداری ادامه داشت. مقدار ۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی 10^6 CFU باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* (ATCC14028)، با روش گاواژ چینه‌دان (توسط سوند معدی)، در دهان تمام جوجه‌ها تلقیح گردید (Lopes PD, Freitas Neto OC, Batista DFA, Denadai J, Alarcon MFF, Almeida AM, 2016). در طول دوره، حرارت و رطوبت محل نگهداری جوجه‌ها، به ترتیب برابر با ۲±۳۲ درجه سانتی‌گراد و ٪۵±۶۰ بود. جوجه‌ها طی این مدت با استفاده از پلت استاندارد (پری‌استاتر و استاتر) تغذیه شدند؛ آب نیز بدون محدودیت خاصی در اختیار آن‌ها قرار داده شد (Bustamante E, Guijarro E, García-Diego FJ, Balasch S, Hospitaler A, 2012). در روزهای پنجم و سیزدهم پس از القای باکتری، نمونه‌گیری انجام گرفت و پس از مرگ با ترحم، بافت کبد و طحال جدا و به ظرف‌های نمونه‌گیری انتقال داده شد. جهت تعیین بار میکروبی موجود در دو بافت کبد و طحال، از آزمون Real-time PCR و تست‌های میکروبیولوژی و هم‌چنین برای بررسی میزان آسیب *سالمونلا تیفی‌موریوم* در بافت‌ها، از روش‌های هیستوپاتولوژی استفاده گردید.

ارزیابی تأیید حضور باکتری با کالبدگشایی

بعد از نمونه‌گیری، ارگان‌های داخلی جوجه‌ها از نظر تأیید حضور باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم*، مورد بررسی کالبد گشایی قرار گرفت و پدیده‌هایی مانند، التهاب و عدم جذب کیسه زرده، مدفوع گچی، تورم و پرخونی کبد و طحال، مشاهده شد (Gutierrez A, 2022).

آزمون Real-time PCR

Real-time PCR، روشی استاندارد برای شناسایی و تشخیص میکروارگانیسم‌ها و نشانگرهای خاص ژنتیکی، در انواع مختلف نمونه‌ها بکار می‌رود. حساسیت، سرعت بالا و تکرارپذیری، از مزایا این روش تشخیصی می‌باشد؛ بدین منظور برای شمارش کمی *سالمونلا تیفی‌موریوم* در بافت کبد و طحال در تیمارهای آزمایشی، از این روش استفاده گردید. برای

این تست، ابتدا میزان یکسان (۱گرم) از بافت کبد و طحال همه گروه‌های برداشته و بعد از تهیه عصاره سلولی، DNA موجود در بافت‌ها به روش فنول کلروفرم ایزو آمیل الکل، استخراج گردید. سپس در میکروتیوپ‌های ۰/۲ میلی‌لیتری، میزان ۱۰ میکرولیتر از مخلوط PCR (PCR master mix) شرکت سیناکلون، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای Forward (GCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA) و Reverse (GGTAGAAATTCCCAGCGGGTACTGG) مرتبط با DNA *سالمونلا تیفی‌موریوم* (Javan J, Staji, H., Ghazvinian, K., Javaheri Vayeghan, A., Salimi, M. R., Mahdavi, 2012)، ۵ میکرولیتر DNA استخراج شده از هر نمونه و ۳ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استریل شده، جمعا به میزان ۲۰ میکرولیتر، ریخته شد (Staji H, Tonelli A, Javaheri-Vayeghan A, Changizi E, 2015; Staji H, Khoshgoftar J, Javaheri Vayeghan A, 2017).

برای تهیه نمونه کنترل مثبت، از نیم مک‌فارلند، رقت ۰/۱ تهیه و S_1 نامیده شد سپس با رقت سازی سریالی تا 10^{-5}، ۵ استاندارد به نام‌های (S_1، S_2، S_3، S_4 و S_5) به وجود آمد. به جای نمونه کنترل منفی از آب مقطر استفاده و تمامی نمونه‌ها در دستگاه از قبل تنظیم شده، قرار داده شد (Staji H, Birgani SF, 2018; Flores-Ramírez A, Ortega-Cuenca J, Cuetero-Martínez Y, de Los Cobos D, 2023).

سیکل‌های آستانه به صورت نمودار خطی و منحنی توسط دستگاه Real-time PCR رسم شد و اعدادی بر حسب حد آستانه ((Cycle Threshold (CT)) به‌دست آمد و با استفاده از روش Oneway Anova، مورد آنالیز آماری قرار گرفت و داده‌ها در قالب گراف بیان شدند.

تست‌های میکروبیولوژی و شمارش کلونی

مقدار ۱ گرم از بافت کبد و طحال جوجه‌های گوشتی مورد مطالعه، جداسازی و به همراه ۱ سی‌سی محلول پپتون‌واتر، درون هاون ریخته شد و کاملاً مخلوط گردید. سوسپانسیون به دست آمده را به یک لوله آزمایش با ۹ سی‌سی پپتون‌واتر انتقال و رقت 10^{-1} ساخته شد. سپس به صورت سریال دایلوشن تا رقت 10^{-3} این کار ادامه پیدا کرد. برای کشت باکتری میزان ۱۰۰ لاندا از هر سه رقت با ۵ بار تکرار برداشته و به محیط کشت SS آگار (Salmonella Shigella Agar) و بلاد آگار (Blood Agar) اضافه و کشت سطحی داده شد. پلیت‌های بلاد آگار به مدت ۲۴ ساعت با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و پلیت‌های SS آگار به مدت ۴۸ ساعت با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، درون انکوباتور قرار گرفت و سپس شمارش کلونی انجام شد (Zhou Z, Pan C, Lu Y, Gao Y, Liu W, Yin P, 2017; Farikoski IO, Medeiros LS, Carvalho YK, Ashford DA, Figueiredo EE, Fernandes DV, Silva PJ, 2019).

بررسی هیستوپاتولوژی

مکعب‌هایی یکسانی با اندازه حدودی ۱ سانتی‌متر مکعب، از بافت کبد و طحال نمونه‌ها، به صورت جداگانه کد گزاری شدند و در ظرف‌های حاوی ۶۰ میلی‌لیتر محلول فرمالین ۱۰ درصد نگهداری شدند و بعد از گذشت ۲۴ ساعت، فرمالین قدیم با جدید تعویض شد و تمام پروسه آبگیری با الکل، شفاف سازی به کمک گزیلل، آغشته سازی با پارافین، کد گذاری نمونه‌ها، قالب زنی، برش و رنگ‌آمیزی با رنگ هماتوکسیلین ائوزین (Haematoxylin and Eosin)، طبق پروتکل انجام گرفت (Bescucci DM, Moote PE, Ortega Polo R, Uwiera RR, 2020).

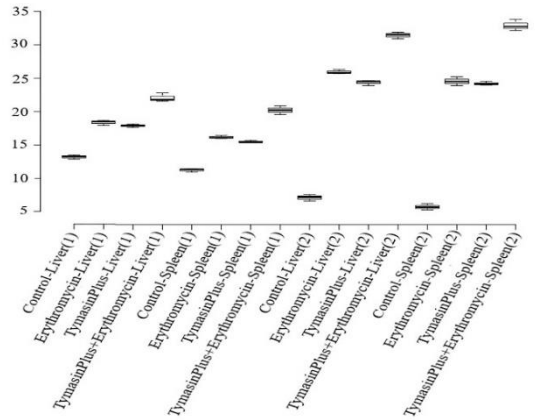
برای بررسی نتایج هیستوپاتولوژی، روش درجه بندی انتخاب شد. لام‌های تهیه شده از بافت طحال از نظر

رسوب آهن (Hemosiderosis) و تخلیه لنفاوی (Lymphatic Drainage) و لام‌های بافت کبد از نظر نکروز (Necrosis) و التهاب (Inflammation)، به طور کاملاً تصادفی با عدسی‌های ۴، ۱۰ و ۴۰ مورد بررسی قرار گرفت. سپس هر لام در چهار شان میکروبی با درشت نمایی ۴۰۰ X یا لنز ۴۰، مشاهده و هر عارضه به‌صورت جداگانه در لام‌ها، برحسب میزان آسیب درجه‌بندی شدند، به این صورت که که اگر در هیچ شان عارضه‌ای دیده نشد، درجه آن ۰ می‌شود، اگر در یک شان عارضه دیده شد درجه آن ۱، در دو شان عارضه دیده شد درجه آن ۲، اگر در ۳ شان عارضه دیده شد درجه آن ۳ و اگر در ۴ شان عارضه دیده شد درجه آن ۴ می‌شود (Gerivani B,Staji H, Rassouli M, Ghazaleh N, 2020). نتایج مربوط به تست‌های انجام گرفته با نرم افزار One-way ANOVA، با اختلاف معیار (*Pvalue*) ۰/۰۵ (*P*<۰/۰۵) مورد بررسی آماری قرار گرفت.

نتایج

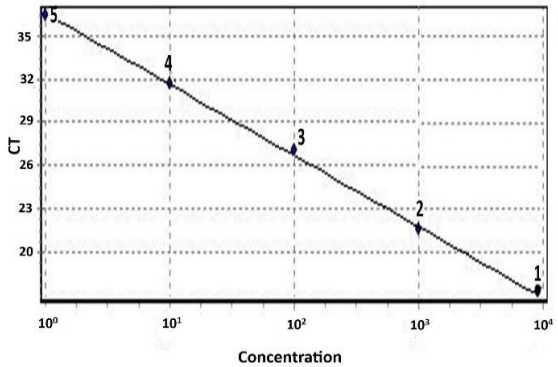
نتایج آزمون Real-time PCR

برای تفسیر نتایج حاصل از آزمون Real-time PCR به میزان چرخه‌های آستانه (Ct) توجه می‌کنیم، به این صورت که، هرچه میزان چرخه‌های آستانه کمتر باشد یعنی میزان تکثیر و بیان باکتری بیشتر بوده است و در مقابل هرچه میزان چرخه آستانه بیشتر باشد، میزان تکثیر و بیان باکتری کمتر بوده است به عبارت دیگر، در گروه‌هایی که میزان باکتری کمتر باشد، شاهد مقدار چرخه آستانه بالاتری هستیم. ب در این پژوهش، کمترین میزان چرخه آستانه به گروه‌های ترکیب آنتی‌بیوتیک اریترومایسین و شربت تیماسین‌پلاس® اختصاص داشت (تصویر۱).



تصویر۱. نمودار میزان چرخه‌های آستانه در گروه‌های مورد مطالعه در نمونه‌گیری اول و دوم. محور عمودی، میزان عدد چرخه‌های آستانه و محور افقی، نام گروه‌های مورد بررسی.

نمودار استاندارد (Standard curve) نشانگر غلظت DNA تکثیر شده، در چرخه‌های آستانه مختلف است (تصویر۲).

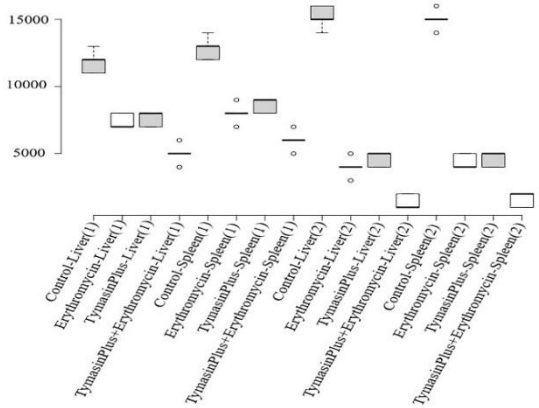


تصویر۲. نمودار استاندارد بیانگر میزان غلظت باکتری برحسب چرخه‌های آستانه. محور عمودی میزان عدد چرخه‌های آستانه و محور افقی غلظت باکتری.

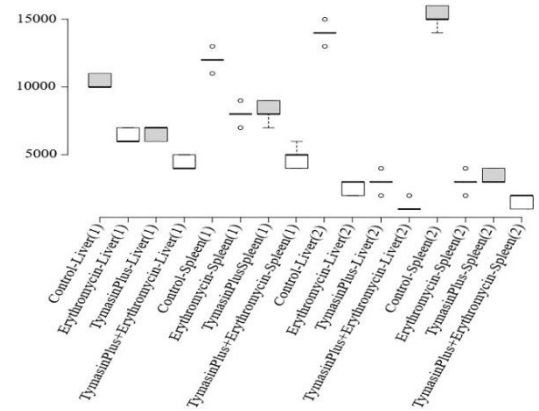
نتایج تست میکروبی

باکتری‌های رشد یافته در دو محیط SS آگار و بلاد آگار در غلظت 10^{-1} با روش کلونی کانت، شمارش شد. نتایج به دست آمده نشان داد، در هر دو محیط کشت، میزان باکتری در گروه کنترل از سایر گروه‌ها بیشتر و بعد از آن به ترتیب گروه شربت تیماسین‌پلاس® و آنتی‌بیوتیک اریترومایسین قرار

داشت. کمترین میزان باکتری مشاهده شده مربوط به گروه، ترکیب شربت تیماسین‌پلاس® و آنتی‌بیوتیک اریترومایسین بود. هم‌چنین در تمام گروه‌های مورد مطالعه، میزان باکتری در بافت طحال نسبت به کبد بیشتر بود (تصویر ۴و۳).



تصویر۳. نمودار میزان باکتری رشد یافته در محیط کشت SS آگار در نمونه‌گیری اول و دوم. محور عمودی میزان باکتری و محور افقی نام گروه‌های مورد مطالعه.

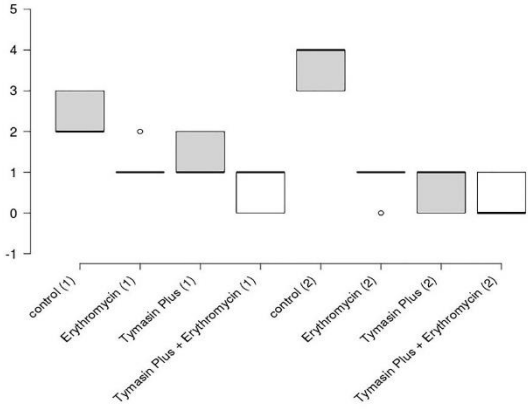


تصویر۴. نمودار میزان باکتری رشد یافته در محیط کشت بلاد آگار در نمونه‌گیری اول و دوم. محور عمودی میزان باکتری و محور افقی نام گروه‌های مورد مطالعه.

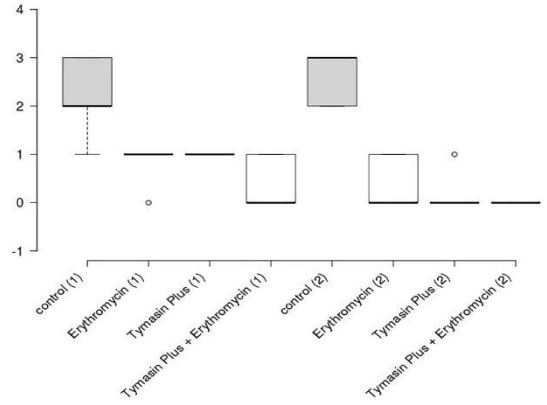
نتایج بررسی هیستوپاتولوژی

آسیب‌های بافتی وارد شده به نمونه‌های مورد مطالعه، شامل تخلیه بافتی طحال (تصویر۵)، هموسیدروز طحال (تصویر۶)، نکروز کبد (تصویر۷) و التهاب کبد (تصویر۸) در دو نمونه‌گیری اول و دوم با یکدیگر مقایسه شدند و نتایج حاصل از این بررسی نشان داد بیشترین میزان آسیب‌بافتی وارد شده، مربوط به گروه کنترل در هر دو نمونه‌گیری می‌باشد و اختلاف معنی‌داری بین این گروه با سایر گروه‌ها وجود دارد. در گروه درمان با ترکیب اریترومایسین و شربت تیماسین‌پلاس کمترین میزان آسیب مشاهده شد (۰/۰۵ >P). گروه درمان با آنتی‌بیوتیک اریترومایسین و شربت تیماسین‌پلاس نتایج تقریبا مشابهی داشتند و می‌توان نتیجه گرفت تیماسین‌پلاس و اریترومایسین دارای عملکردی یکسان در کاهش میزان آلودگی و آسیب بوده‌اند.

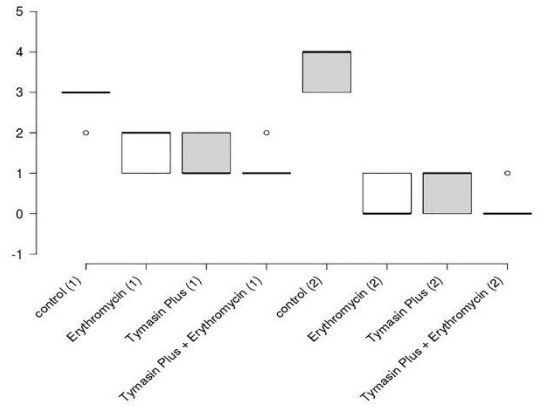
تفاوت نتایج در بررسی هیستوپاتولوژی با دو آزمون میکروبی دیگر، نشان داد که تغییرات مولکولی زودتر از تغییرات سلولی بوجود می‌آید.



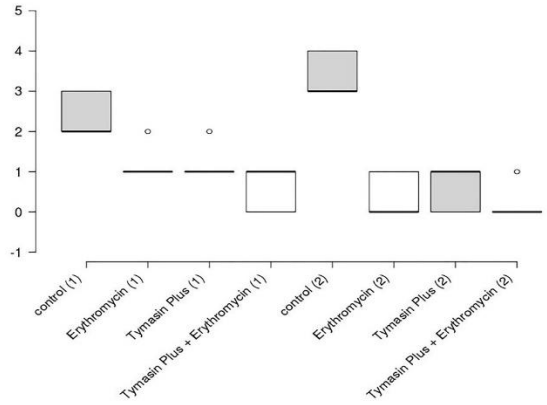
تصویر۵. نمودار مقایسه تخلیه بافت طحال در نمونه‌گیری اول و دوم. محور عمودی درجه‌بندی میزان آسیب بافتی و محور افقی نام گروه‌های مورد مطالعه.



تصویر۶. نمودار مقایسه هموسیدروز طحال در نمونه‌گیری اول و دوم. محور عمودی درجه‌بندی میزان آسیب بافتی و محور افقی نام گروه‌های مورد مطالعه.



تصویر۷. نمودار مقایسه نکروز کبد در نمونه‌گیری اول و دوم. محور عمودی درجه‌بندی میزان آسیب بافتی و محور افقی نام گروه‌های مورد مطالعه.



تصویر۸. نمودار مقایسه التهاب کبد در نمونه‌گیری اول و دوم. محور عمودی درجه‌بندی میزان آسیب بافتی و محور افقی نام گروه‌های مورد مطالعه.

بحث

طی بررسی‌هایی که بین سال‌های ۲۰۲۱-۲۰۱۱ توسط Shen W و همکاران در سال ۲۰۲۲، Farikoski IO و همکاران در سال ۲۰۱۹، Oladeinde A و همکاران در سال ۲۰۱۹، Malek Pour و همکاران در سال ۲۰۱۹، استاجی و همکاران در سال ۲۰۱۷ و Pouyan و همکاران در سال ۲۰۲۱، انجام گرفت، مشخص شد، در بین ۴۷۱۴ ایزوله جداسازی شده از انسان، حیوانات، غذاها و محیط‌زیست، بیشترین مقادیر مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک (≤ ۷۵٪) مربوط به تتراسایکلین، آمپی‌سیلین، سولفیسوکسازول و استرپتومایسین؛ (۵۰-۷۵٪) برای نالیدیکسیک‌اسید، آموکسی‌سیلین، اسیدکلاوولانیک و کلرامفنیکل؛ (۲۵-۵۰٪) برای تری‌متوپریم، سولفامتوکسازول، کاناماسین، تری‌متوپریم و جنتامایسین و (≥ ۲۵٪) یا کمترین میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین، اریترومایسین، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سفپیم، سفتازیدیم و کولیستین بوده است (۲۹، ۴۰-۳۶). Aelenei P و همکاران در ۲۰۱۹ به مقایسه اثر دو آنتی‌بیوتیک اریترومایسین و جنتامایسین بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی پرداختند و دریافتند اریترومایسین دارای اثر مهاری بهتری بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* و *اشرشیاکلی* نسبت به جنتامایسین است (Aelenei P, Rimbu CM, Guguianu E, Dimitriu G, Aprotosoaie AC, Brebu M, Horhogea CE, 2019). در پژوهشی دیگر، Galgano و همکاران در سال ۲۰۲۳، به بررسی اثر چندین آنتی‌بیوتیک مختلف برروی سویه‌های *سالمونلا انتریکا*، *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*، پرداختند و دریافتند که اثر

آنتی‌بیوتیکی ماکرولیدها شامل اریترومایسین، آزیترومایسین بیشتر از سایر آنتی‌بیوتیک‌ها مانند ونکومایسین، آموکسی‌سیلین، کلیندامایسین و... می‌باشد (Galgano M, Pellegrini F, Fracchiolla G, Mrenoshki D, Zarea AA, Bianco A, Del Sambro L, Capozzi L, Schiavone A, Saleh MS, 2023). با توجه به این نتایج، آنتی‌بیوتیک اریترومایسین به عنوان آنتی‌بیوتیک کاندید در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت. استاجی و همکاران در سال ۲۰۱۸، اعلام کردند، عفونت‌زایی در طیور ممکن است یک مسیر بالقوه برای ورود باکتری‌های بیماری‌زا به زنجیره غذایی و افزایش تعداد میزبان باشد (Staji H, Birgani SF, 2018). بنابراین انجام اقداماتی در جهت کاهش عفونت بدون ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی، امری حیاتی تلقی می‌شود. به این منظور چندین سال است، داروهای گیاهی مورد توجه همگان قرار گرفته است و به نظر می‌رسد می‌توان از آن‌ها به صورت جایگزین و یا هم‌افزایی آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های باکتریایی استفاده کرد. آویشن باغی و ختمی دو گیاه استفاده شده در این پژوهش‌اند که به تنهایی دارای خواص بسیار می‌باشند. اسانس آویشن در حال حاضر در سطح جهانی به عنوان یک نگهدارنده طبیعی مواد غذایی، با اثرات آنتی اکسیدانی، ضد باکتریایی و ضد قارچی شناخته شده است. طبق بررسی‌های بیوانفورماتیکی که Marques J و همکاران در سال ۲۰۲۳، حول محور اتصال مولکولی و تجزیه و تحلیل همبستگی اجزای آویشن انجام دادند، ثابت شد، اتصال و پیوند مولکولی قوی بین کارواکرول و تیمول، با حوزه‌های عملکردی پروتئین حدت، مانع از انتشار و آسیب میکروارگانیسم به سایر ارگان‌های بدن میزبان می‌شوند (Monteiro Marques J, Serrano S, Selmi H, Giesteira Cotovio P, 2023) هم‌چنین مختاری و همکاران در سال ۲۰۲۳، ثابت کردند که عصاره آویشن با قدرت مهار رادیکال‌های آزاد، هگزان و کلاته‌کنندگی آهن پلاسما، حائز اهمیت است؛ این ترکیبات می‌تواند با مهار آنزیم‌های باکتریایی، افزایش نفوذپذیری غشای سلولی و سنتز اجزای شبه ساختاری، ماده ژنتیکی را از نظر عملکردی مختل کند. به طور کلی عصاره‌های حاوی ترکیبات فنلی مانند تیمول، کارواکرول و اوژنول در سطوح بالا، اثر ضد میکروبی قوی بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا دارند (Mokhtari R, Kazemi Fard M, Rezaei M, Moftakharzadeh SA, 2023). Galgano و همکاران در سال ۲۰۲۳، از عصاره آویشن باغی به عنوان یک ترکیب ضد میکروبی برای از بین بردن *سالمونلا دربی*، *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در بستر طیور استفاده کردند (Galgano M, Pellegrini F, Fracchiolla G, Mrenoshki D, Zarea AA, Bianco A, Del Sambro L, Capozzi L, Schiavone A, Saleh MS, 2023). گیاه ختمی حاوی پکتین ۱۱درصد، موسیلاژ، اسید فنولیک، اسکوپولتین، فلاونوئیدها، کومارین‌ها و فیتواسترول‌ها می‌باشد و در کاهش عفونت بسیار مفید می‌باشد. گیاه ختمی دارای فواید پزشکی زیاد و بدون عوارض جانبی جدی است. این عصاره، به دلیل خواص ضد التهابی و ضد میکروبی به عنوان یک داروی گیاهی سنتی برای التیام زخم شناخته شده است. خواص موسیلاژینی، اثرات مرطوب کنندگی و تغذیه‌ای بر تکثیر سلول‌های پوستی دارد. برخی از پلی ساکاریدهای موجود در ختمی که از نوع رامنوگالاکتورونان هستند، تشکیل بافت‌های موسینی در بالای بافت‌های تحریک شده و آسیب دیده را به عهده دارند (Ayrle H, Mevissen M, Kaske M, Nathues H, Gruetzner N, Melzig M, 2016). به طور کلی از عصاره ختمی برای عفونت‌های دستگاه گوارش و مجاری ادراری و هم‌چنین برای التهاب، زخم، آبسه، یبوست و اسهال

استفاده می‌شود. فلاونوئیدهای موجود در ختمی، تأثیر بسیار قوی‌تر از فنیل بوتازون در سرکوب فاز حاد التهاب داشتند؛ هم‌چنین فاز التهابی برخلاف فنیل بوتازون، موجب فرسایش معده نمی‌شود و وجود هیپولاتین ۸-گلوکوزید، کاهش درد در بیماران را به همراه دارد (Pausan MR, 2022). داروی گیاهی تیماسین‌پلاس® به طور معمول برای درمان برونشیت، گلودرد و تسکین سرفه استفاده می‌شود اما با توجه به مواد موثر این دارو که شامل آویشن باغی و ختمی می‌باشد و تاثیر ضد میکروبی هر یک از این عناصر به تنهایی، بررسی تاثیر ضدمیکروبی این دارو بر روی عفونت *سالمونلا تیفی‌موریوم*، به یکی از اهداف این پژوهش مبدل شد.

معصومی‌پور و همکاران در سال ۱۳۹۸، ثابت کردند که تاثیر ضدمیکروبی ترکیب سه عصاره کلپوره، فلفل سیاه و چای سبز بر باکتری‌های پاتوژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک نسبت به حالت منفرد، بسیار زیاد و قابل مقایسه نیست (Masoumipour F, Hassanshahian M, Sasan H, 2019) همچنین Amenu D در سال ۲۰۱۴، ثابت کرد ترکیب عصاره گیاهان خرزهره، جینسنگ هندی، درمنه دشتی و انجیر سیکامور نسبت به حالت تکی این عناصر، در برابر سویه‌های *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، اثر ضدمیکروبی بیشتری دارند (Amenu D, 2016). Moussii IM و همکاران در سال ۲۰۲۰ پی بردند که ترکیب سه عصاره درمنه دشتی، اسطوخودوس و رزماری اثر ضدمیکروبی زیادی بر روی سه سویه *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* دارند (Moussii IM, Nayme K, Timinouni M, Jamaleddine J, Filali H, 2020) Malek Pour و همکاران در سال ۲۰۱۹ از ترکیب دو اسانس کافور و میخک برای مهار تولید TEMbla در *اشرشیاکلی* جدا شده از کولی باسیلوز طیور استفاده کردند و با استفاده از تست MIC ثابت کردند، ضمن اثر مهاری هر یک از این اسانس‌ها به تنهایی، ترکیب این دو نیز دارای قدرت بازدارندگی زیادی بر روی جدایه *اشرشیاکلی* می‌باشد (Malekpour B, Kafshdouzan K, Javan AJ, 2019). همچنین Pouyan و همکاران در سال ۲۰۲۱، به اثر مهاری اسانس دارچین و پونه چه به صورت تکی و ترکیبی با یکدیگر بر تولید bla CTX-M بر سویه‌های *اشرشیاکلی* با تست MIC پی بردند (Pouyan S, Kafshdouzan K, 2021). با توجه به بررسی‌های صورت گرفته مشخص شد، ترکیب دو یا چند عصاره گیاهی، نسبت به استفاده از تک عصاره، خاصیت درمانی و ضدمیکروبی بیشتری را دارا می‌باشد و این تصور که خاصیت مواد مؤثر موجود در گیاهان در همبستگی با یکدیگر تشدید می‌شود، دور از انتظار نیست (Mokhtari R, Kazemi Fard M, Rezaei M, Moftakharzadeh SA, 2023). استفاده همزمان داروهای گیاهی و آنتی‌بیوتیک‌ها به نوع گیاه و ماده شیمیایی بستگی دارد و می‌تواند سه واکنش هم‌افزایی، بی اثر و مضر را از خود نشان دهد. کاهش مقدار مصرف آنتی‌بیوتیک و یا کاهش تعداد دفعات مصرف، در مقابل تاثیر ضدمیکروبی بسیار زیاد، از دلایل اهمیت و توجه به اثر هم‌افزایی آنتی‌بیوتیک با داروی گیاهی می‌باشد. مطالعات زیادی برروی بررسی اثر هم‌افزایی انجام گرفته است، بطور مثال زاهدی و همکاران در سال ۱۳۹۴، اثر هم‌افزایی آنتی‌بیوتیک فسفومایسین و اسانس گیاه لیمو عمانی بر روی ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین *استافیلوکوکوس اورئوس* (Zahedi B , Eghbal J, Zartoshti M, 2015) محمدپور و همکاران در سال ۱۴۰۲، اثر هم‌افزایی

آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول و عصاره سیاهدانه بر روی سویه‌ی استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس*، (Mohammadpour P, Ahmadi M, Niakan M, Rahimi F, 2023) اسدی و همکاران در سال ۱۴۰۲، اثر هم‌افزایی آنتی‌بیوتیک سفکسیم و کارواکرول بر روی باکتری *اشرشیاکلی* (Asadi S, Nayeri Fasaei B, Zahraei Salehi T, Yahya Rayat R, 2023)، استاجی و همکاران در سال ۲۰۲۰، اثر هم‌افزایی آنتی‌بیوتیک اریترومایسین و بزاق زالو بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (Gerivani B,Staji H, Rassouli M, Ghazaleh N, 2020) و Aelenei P و همکاران در سال ۲۰۱۹، اثر هم‌افزایی عصاره گشنیز با آنتی‌بیوتیک اریترومایسین بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* و *اشرشیاکلی* (Aelenei P, Rimbu CM, Guguianu E, Dimitriu G, Aprotosoaie AC, Brebu M, Horhogea CE, 2019)، ثابت کردند. طبق نتایج این پژوهش‌ها، بررسی اثر هم‌افزایی داروی گیاهی تیماسین‌پلاس® و آنتی‌بیوتیک اریترومایسین، دومین هدف مورد بررسی در این پژوهش بود.

Dar MA و همکاران در سال ۲۰۱۹، برای بررسی میزان بیان ژن و پاسخ آنتی بادی از DNA موجود در بافت‌های کبد، طحال و روده، جوجه‌های گوشتی چالش یافته شده با *سالمونلا تیفی‌موریوم*، با استفاده از آزمون Real-time PCR استفاده کردند (Dar MA, Urwat U, Ahmad SM, Ahmad R, Kashoo ZA, Dar TA, Bhat SA, Mumtaz PT, Shabir N, Shah RA, 2019) همچنین در پژوهش دیگر که در سال ۲۰۱۹ توسط Liu N و همکاران انجام گرفت، برای بررسی اثر بخشی مکمل تترامتیل پیرازین در کاهش میزان باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* در جوجه‌های گوشتی، از نمونه DNA موجود در بافت کبد و طحال استفاده شد و مقدار باکتری موجود با تست Real-time PCR سنجیدند (Liu N, Lin L, Wang JQ, Zhang FK, 2019). Malekpour و همکاران در سال ۲۰۱۹، برای بررسی کمی میزان اثر بخشی دو اسانس کافور و میخک بر مهار تولید TEM_{bla} در *اشرشیاکلی* از تست Real-time PCR برای ردیابی ژن مورد نظر استفاده کردند (Malekpour B, Kafshdouzan K, Javan AJ, 2019). Pouyan و همکاران در سال ۲۰۲۱، از روش Real-time PCR برای بررسی میزان اثر هم‌افزایی ترکیب دو عصاره دارچین و پونه بر مهار تولید bla_{CTX-M} در *اشرشیاکلی* جدا شده از کولی باسیلوز طیور استفاده کردند (Pouyan S, Kafshdouzan K, 2021). Raheem و همکاران در سال ۲۰۲۱، به بررسی اثر ضدمیکروبی دو گیاه زیره سیاه و زردچوبه بر علیه باکتری گرم منفی *پاستورلا مولتوسیدا* در جوجه‌های گوشتی پرداختند، در این پژوهش ضمن آلودگی طیور و سپس درمان با گیاهان مدنظر، از بررسی هیستوپاتولوژی بافت کبد، طحال و ریه برای بررسی میزان اثربخشی گیاهان فوق استفاده کردند (Raheem MA, Jiangang H, Yin D, Xue M, ur Rehman K, Rahim MA, Gu Y, Fu D, Song X, Tu J, 2021). در پژوهش دیگری که در سال ۲۰۲۰ توسط Chen C و همکاران صورت گرفت، از پروبیوتیک برای از بین بردن باکتری *سالمونلا پلوروم* در جوجه‌های گوشتی استفاده شد، در این پژوهش، محلول پروبیوتیک به صورت گاواژ چینه‌دان به جوجه‌ها خورانده و سپس از نمونه بافت کبد و طحال برای بررسی میزان اثر بخشی پروبیوتیک استفاده شد (Chen C, Li J, Zhang H, Xie Y, Xiong L, Liu H, 2020). در این پژوهش میزان آسیب بافتی و تعداد باکتری‌های موجود در بافت طحال تا حدودی بیشتر از بافت کبد گزارش شد که بنظر می‌رسد دلیل این اتفاق

به مکانسیم عمل این دو بافت برمی‌گردد. از آنجایی که بافت طحال بزرگترین بافت لنفاوی بدن است و مسئولیت فاگوسیتوز و تصفیه خون برعهده دارد، پس بالا بودن آسیب و تغییرات بالای مورفولوژی مانند پرخونی و.. در این بافت دور از انتظار نیست.

نتیجه‌گیری نهایی

با مطالعه نتایج حاصل از تست‌های Real-time PCR، شمارش کلونی در دو محیط SS آگار و بلاد آگار و بررسی‌های پاتولوژی، مشخص شد، شربت تیماسین‌پلاس® توانسته میزان باکتری را کاهش دهد و نتایجی شبیه به گروه درمان با آنتی‌بیوتیک اریترومایسین داشته باشد، اما بطور کلی ترکیب شربت تیماسین‌پلاس® و آنتی‌بیوتیک اریترومایسین بهترین نتایج را نشان داد و مؤفق‌ترین گروه در کاهش میزان باکتری بوده است و مشخص شد، ترکیب این دو ماده نه تنها برای بیمار، ضرری ندارد بلکه می‌توان با استناد به اثر هم‌افزایی، بجای استفاده از آنتی‌بیوتیک در دوز بالا یا مدت زمان بیشتر، از این ترکیب در زمان کوتاه‌تر و مقدار آنتی‌بیوتیک کمتر، بهترین نتیجه را مشاهده کرد.

تاییدیه اخلاقی

پژوهش حاضر با کد اخلاق IR.SU.REC.1402.6، در دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان و طبق دستورالعمل‌ها کمیته اخلاق، انجام گرفت.

تعارض منافع

بین نویسندگان، تعارض در منافع گزارش نشده است.

منابع

1. Aelenei P, Rimbu CM, Guguianu E, Dimitriu G, Aprotosoaie AC, Brebu M, Horhogea CE, M.A. (2019) “Coriander essential oil and linalool–interactions with antibiotics against Gram- positive and Gram- negative bacteria,” *Letters in applied microbiology*, 68(2), 64_156 .
2. Álvarez-Ordóñez A, Begley M, Prieto M, Messens W, López M, Bernardo A, H.C. (2011) “Salmonella spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract,” *Microbiology*, 157(12), 81_3268 .
3. Amenu D (2016) “Antimicrobial activity of medicinal plant extracts and their synergistic effect on some selected pathogens,” *American Journal of Ethnomedicine*, 1(1), 29_18 .
4. Antih J, Houdkova M, Urbanova K, K.L. (2021) “Antibacterial activity of Thymus vulgaris L. essential oil vapours and their GC/MS analysis using solid-phase microextraction and syringe headspace Sampling Techniques.,” *Molecules*, 26(21)(6553).
5. Asadi S, Nayeri Fasaei B, Zahraei Salehi T, Yahya Rayat R, S.N. (2023) “Evaluation of the Antibacterial Effect of Carvacrol Alone and in Combination with the Antibiotic Cefixime Against Escherichia coli O157:H7,” *Journal of Veterinary Research*, 78(1), 76_67 .
6. Ayrle H, Mevissen M, Kaske M, Nathues H, Gruetzner N, Melzig M, W.M. (2016) “Medicinal plants–prophylactic and therapeutic options for gastrointestinal and respiratory diseases in calves and piglets? A systematic review,” *BMC veterinary research*, 12, 31_1 .
7. Balasubramanian D, López-Pérez M, Grant TA, Ogbunugafor CB, A.-M.S. (2022) “Molecular mechanisms and drivers of pathogen emergence,” *Trends in Microbiology* .

8. Barreto, M., Castillo-Ruiz, M. and Retamal, P. (2016) "Salmonella enterica: a review or the trilogy agent, host and environment and its importance in Chile," *Rev. Chil. Infectología*, 33(5), 557_547 .
9. Bescucci DM, Moote PE, Ortega Polo R, Uwiera RR, I.G. (2020) "Salmonella enterica serovar Typhimurium temporally modulates the enteric microbiota and host responses to overcome colonization resistance in swine," *Applied and Environmental Microbiology*, 86(21), e01569-20.
10. Bustamante E, Guijarro E, García-Diego FJ, Balasch S, Hospitaler A, T.A. (2012) "Multisensor system for isotemporal measurements to assess indoor climatic conditions in poultry farms," *Sensors*, 12(5), 74_5752 .
11. Castellanos, L.R., van der Graaf-van Bloois, L., DonadoGodoy, P., León, M., Clavijo, V., Arévalo, A., Bernal, J.F. و Mevius, D.J., Wagenaar, J.A., Zomer, A. and Hordijk, J. (2018) "Genomic Characterization of Extended-Spectrum Cephalosporin-Resistant Salmonella enterica in the Colombian Poultry Chain," *Front. Microbiol*, 9, 1_11 .
12. Chen C, Li J, Zhang H, Xie Y, Xiong L, Liu H, W.F. (2020) "Effects of a probiotic on the growth performance, intestinal flora, and immune function of chicks infected with Salmonella pullorum," *Poultry Science*, 99(11), 23_5316 .
13. Dar MA, Urwat U, Ahmad SM, Ahmad R, Kashoo ZA, Dar TA, Bhat SA, Mumtaz PT, Shabir N, Shah RA, H.M. (2019) "Gene expression and antibody response in chicken against Salmonella Typhimurium challenge," *Poultry Science*, 98(5), 13_2008 .
14. El-Saadony MT, Salem HM, El-Tahan AM, Abd El-Mageed TA, Soliman SM, Khafaga AF, Swelum AA, Ahmed AE, Alshammari FA, A.E.-H.M. (2022) "The control of poultry salmonellosis using organic agents: an updated overview," *Poultry Science*, 101(4), 101716 .
15. Farikoski IO, Medeiros LS, Carvalho YK, Ashford DA, Figueiredo EE, Fernandes DV, Silva PJ, R.V. (2019) "The urban and rural capybaras (Hydrochoerus hydrochaeris) as reservoir of Salmonella in the western Amazon, Brazil," *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 39, 9_66 .
16. Flores-Ramírez A, Ortega-Cuenca J, Cuetero-Martínez Y, de Los Cobos D, N.A. (2023) "Viability and removal assessment of Escherichia coli and Salmonella spp. by real-time PCR with propidium monoazide in the hygienization of sewage sludge using three anaerobic processes," *Waste Management*, 161, 62_25 .
17. Galán JE (2021) "Salmonella Typhimurium and inflammation: a pathogen-centric affair," *Nature Reviews Microbiology*, 19(11), 25_716 .
18. Galgano M, Pellegrini F, Fracchiolla G, Mrenoshki D, Zarea AA, Bianco A, Del Sambro L, Capozzi L, Schiavone A, Saleh MS, C.M. (2023) "Pilot Study on the Action of Thymus vulgaris Essential Oil in Treating the Most Common Bacterial Contaminants and Salmonella enterica subsp. enterica Serovar Derby in Poultry Litter," *Antibiotics*, 12(3), 436_448 .
19. Gerivani B,Staji H, Rassouli M, Ghazaleh N, V.A. (2020) "Co-administration of erythromycin and leech salivary extract alleviates osteomyelitis in rats induced by methicillin-resistant Staphylococcus aureus," *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 33(4), 51_243 .
20. Gutierrez A, S.K. (2022) "Survival and inactivation kinetics of Salmonella enterica serovar Typhimurium in

irradiated and natural poultry litter microcosms," *PLoS One*, 17(4), e0267178.
21. Hao G, Li P, Huang J, Cui K, Liang L, Lin F, Lu Z, S.S. (2023) "Research Note: Therapeutic effect of a Salmonella phage combination on chicks infected with Salmonella Typhimurium," *Poult Sci*, 102(7), 102715 .
22. Hossain MJ, Attia Y, Ballah FM, Islam MS, Sobur MA, Islam MA, Ievy S, Rahman A, Nishiyama A, Islam MS, H.J. (2021) "Zoonotic significance and antimicrobial resistance in Salmonella in poultry in Bangladesh for the period of 2011–2021," *Zoonoticdis*, 1(1) , 24_3 .
23. Javan J, Staji, H., Ghazvinian, K., Javaheri Vayeghan, A., Salimi, M. R., Mahdavi, A. (2012) "Prevalence of Salmonella spp. in the quail egg interior contents: A provincial study," *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 6(3), 196_191 .
24. Jibril AH, Okeke IN, Dalsgaard A, Menéndez VG, O.J. (2021) "Genomic analysis of antimicrobial resistance and resistance plasmids in Salmonella serovars from poultry in Nigeria," *Antibiotics*, 10(2), 99 .
25. Kaeidi A, Rahmani M, H.J. (2020) "The Protective Effect of Carvacrol and Thymol as Main Polyphenolic Compounds of Thyme on Some Biologic Systems in Disease Condition: A Narrative Review," *JRUMS*, 19(1), 96_81 .
26. Liu N, Lin L, Wang JQ, Zhang FK, W.J. (2019) "Tetramethylpyrazine supplementation reduced Salmonella Typhimurium load and inflammatory response in broilers," *Poultry Science*, 98(8), 64_3158 .
27. Lopes PD, Freitas Neto OC, Batista DFA, Denadai J, Alarcon MFF, Almeida AM, et al (2016) "Experimental infection of chickens by a flagellated motile strain of Salmonella enterica serovar Gallinarum biovar Gallinarum," *Vet J*, 214, 6_40 .
28. Mahboubi M (2020) "Marshmallow (Althaea officinalis L.) and its potency in the treatment of cough," *Complementary medicine research*, 27(3), 83_174 .
29. Malekpour B, Kafshdouzan K, Javan AJ, B.M. (2019) "Inhibition of TEMbla Producing Escherichia coli Isolated From Poultry Colibacillosis Using Cinnamomum camphora and Syzygium aromaticum Essential Oils," *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, 6(3), 94_88 .
30. Marchello CS, Birkhold M, Crump JA, Martin LB, Ansah MO, Breghi G, Canals R, Fiorino F, Gordon MA, Kim JH, H.M. (2022) "Complications and mortality of non-typhoidal salmonella invasive disease: a global systematic review and meta-analysis," *The Lancet Infectious Diseases*, Published.
31. Marquardt, R.R. and Li, S. (2018) "Antimicrobial resistance in livestock□: advances and alternatives to antibiotics," *Anim. Front*, 8(2), 37_30 .
32. Masoumipour F, Hassanshahian M, Sasan H, J.T. (2019) "Antimicrobial Effect of Combined Extract of Three Plants Camellia Sinensis, Teucrium Polium and Piper Nigrum on Antibiotic Resistant Pathogenic Bacteria," *Iran J Med Microbiol*, 13(2), 124_114 .
33. Mohammadpour P, Ahmadi M, Niakan M, Rahimi F, H.F. (2023) "Survey the synergistic effect of the cotrimoxazole and Nigella sativa extract on methicillin resistant Staphylococcus aureus bacteria," *Daneshvar Medicine*, 31(1), 22_13 .
34. Mokhtari R, Kazemi Fard M, Rezaei M, Moftakharzadeh SA, M.A. (2023) "Antioxidant, Antimicrobial Activities, and Characterization of

systematic review and meta-analysis," *Antibiotics*, 11(4), 532 .
42. Raheem MA, Jiangang H, Yin D, Xue M, ur Rehman K, Rahim MA, Gu Y, Fu D, Song X, Tu J, K.I. (2021) "Response of lymphatic tissues to natural feed additives, curcumin (Curcuma longa) and black cumin seeds (Nigella sativa), in broilers against Pasteurella multocida," *Poultry Science*, 100(5), 164_152 .
43. Shen W, Chen H, Geng J, Wu RA, Wang X, D.T. (2022) "Prevalence, serovar distribution, and antibiotic resistance of Salmonella spp. isolated from pork in China: A systematic review and meta-analysis," *International Journal of Food Microbiology*, 361, 109473 .
44. Staji H, Birgani SF, R.B. (2018) "Comparative clustering and genotyping of Campylobacter jejuni strains isolated from broiler and turkey feces by using RAPD-PCR and ERIC-PCR analysis," *Annals of microbiology*, 68(11), 62_755 .
45. Staji H, Khoshgoftar J, Javaheri Vayeghan A, B.M. (2017) "Phylogenetic grouping and assessment of virulence genotypes, with antibiotic resistance patterns, of Escherichia coli strains implicated in female urinary tract infections," *Int J Enteric Pathog*, 4(1), 7_1 .
46. Staji H, Tonelli A, Javaheri-Vayeghan A, Changizi E, S.-B.M. (2015) "Distribution of Shiga toxin genes subtypes in B1 phylotypes of Escherichia coli isolated from calves suffering from diarrhea in Tehran suburb using DNA oligonucleotide arrays," *Iranian journal of microbiology*, 7(4), 197_191 .
47. WHO (2019a) *List of Critically Important Antimicrobials for Human Medicine*.
48. WHO (2019b) *Model List of Essential Medicines*.

Phenolic Compounds of Thyme (Thymus vulgaris L.), Sage (Salvia officinalis L.), and Thyme–Sage Mixture Extracts," *Journal of Food Quality*, 2023.
35. Monteiro Marques J, Serrano S, Selmi H, Giesteira Cotovio P, S.-L.T. (2023) "Antimicrobial and Antibiofilm Potential of Thymus vulgaris and Cymbopogon flexuosus Essential Oils against Pure and Mixed Cultures of Foodborne Bacteria.," *Antibiotics*, 12(3), 565 .
36. Moussii IM, Nayme K, Timinouni M, Jamaleddine J, Filali H, H.F. (2020) "Synergistic antibacterial effects of Moroccan Artemisia herba alba, Lavandula angustifolia and Rosmarinus officinalis essential oils," *Synergy*, 10(1).
37. Owuama CI (2017) "Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) using a novel dilution tube method," *African journal of microbiology research*, 11(23), 80_977 .
38. Pan, H., Paudyal, N., Li, X., Fang, W. and Yue, M. (2018) "Multiple food-animal-borne route in transmission of antibiotic-resistant Salmonella Newport to humans," *Front. Microbiol*, 9,10_1 .
39. Pausan MR (2022) "Marshmallow and its action on inflamed 3D skin model mimicking atopic dermatitis," *Planta Medica*, 88(15), 80_1474 .
40. Pouyan S, Kafshdouzan K, J.A. (2021) "Synergistic Effect of Cinnamomum camphora and Origanum vulgare Essential Oils against bla CTX-M Producing Escherichia coli Isolated from Poultry Colibacillosis," *Journal of Medical Bacteriology*, 10(1), 9_20 .
41. Qin X, Yang M, Cai H, Liu Y, Gorris L, Aslam MZ, Jia K, Sun T, Wang X, D.Q. (2022) "Antibiotic resistance of Salmonella Typhimurium monophasic variant 1, 4,[5], 12: I: -in China: a

C.J. (2023) “Why traditional herbal medicine promotes wound healing: research from immune response, wound microbiome to controlled delivery,” *Adv Drug Deliv Rev*, 195(114764).

54. Zahedi B , Eghbal J, Zartoshti M, H.J.N. (2015) “Evaluation of the synergistic effect of phosphomycin and citrus aurantifolia’s essential oil on methicilin resistant Staphylococcus aureus isolates,” *Studies in Medical Sciences*, 26(4), 327_333 .
55.
56. Zareii B, Seyfi T, Movahedi R, Cheraghi J, E.S. (2014) “Antibacterial Effects of Plant Extracts of Alcea Digitata L., Satureja Bachtiarica L. and Ferulago Angulata L,” *J Babol Univ Med Sci*, 16(1), 37_31 .
57. Zhou Z, Pan C, Lu Y, Gao Y, Liu W, Yin P, Y.X. (2017) “Combination of erythromycin and curcumin alleviates Staphylococcus aureus induced osteomyelitis in rats,” *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 389_379 .
49. Wibisono FM, Wibison FJ, Effendi MH, Plumeriastuti H, Hidayatullah AR, Hartadi EB, S.E. (2020) “A review of salmonellosis on poultry farms: Public health importance,” *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(9), 6_481 .
50. Wu LJ, Luo Y, Shi GL, L.Z. (2021) “Prevalence, clinical characteristics and changes of antibiotic resistance in children with nontyphoidal Salmonella infections from 2009–2018 in Chongqing, China,” *Infection and Drug Resistance*, 13, 13_1403 .
51. Wu Y, Luo L, Wang Y, Chen X, Mo D, Xie L, S.A. (2023) “Strengthened public awareness of one health to prevent zoonosis spillover to humans,” *Science of The Total Environment*, 879(163200).
52. Xiong L, Wang S, Dean JW, Oliff KN, Jobin C, Curtiss III R, Z.L. (2022) “Group 3 innate lymphoid cell pyroptosis represents a host defence mechanism against Salmonella infection,” *Nature microbiology*, 7(7), 99_1087 .
53. Xu Z, Dong M, Yin S, Dong J, Zhang M, Tian R, Min W, Zeng L, Qiao H,

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 19, Issue1,
Spring & Summer 2023

Stady of the effect of Tymasin Plus® herbal medicine on experimental oral infection of *Salmonella typhimurium* in broilers.

Zahra Davoodi[1] ,Hamid Staji[2*], Sahar Ghaffari Khaligh[3], Hesameddin Emadi Chashmi[4]

1. Master's student, Department of Microbial Biotechnology, Faculty of New Technology, Semnan University, Semnan, Iran.

2. Associate professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.

3. Assistant professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.

4. Assistant professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.

Received: 18July 2023 *Accepted: 9 November 2023*

Abstract

Salmonella typhimurium is one of the most important and pathogenic salmonellas that lead to infection in humans, livestock and poultry, and it causes a reduction in production and subsequent economic losses in the poultry industry. Using antibiotics to reduce side effects and kill bacteria in different doses leads to the development of resistance. In plants, the antimicrobial property is inherent in the constituent elements, so they do not accumulate in the body and do not cause the side effects of antibiotics, such as antibiotic resistance, allergic reactions, stomach problems, etc. The present study was conducted to investigate the antimicrobial effect of the herbal medicine Tymasin Plus® and the synergistic effect of this medicine with the antibiotic erythromycin on Salmonella Typhimurium infection in one-day-old chickens Ras 308. For this purpose, 40 one-day-old chickens of Ras 308 breed were used in four groups of ten. An amount of 2 ml of suspension containing 10^6 CFU of Salmonella typhimurium bacteria was experimentally induced to all chickens by gastric tube by layer gavage method. The experimental treatments included negative control (induction of infection but without therapeutic interventions), treatment with erythromycin antibiotic, treatment with Tymasin Plus® syrup (containing Thymus Vulgaris and Althea Officinalis extract), and treatment with the combination of erythromycin antibiotic and Tymasin Plus® syrup. The treatment started 24 hours after the induction of infection and continued until one day before sampling. On the fourth and twelfth days, after death, the liver and spleen tissues were separated for microbial nvestigations, including colony counting, Real-time PCR test, and tissue damage. The results of real-time PCR test and colony count confirmed that Tymasin Plus® syrup has an antimicrobial effect on Salmonella Typhimurium bacteria. In this study, the highest number of bacteria was specific to the control group and the lowest amount was related to the group treated with erythromycin and Tymasin Plus®; Also, in the study of histopathology results of liver and spleen tissue, a significant difference was observed between the control group and other groups. According to this research, it was found that the herbal medicine Tymasin Plus® has the same function as erythromycin and is effective in reducing the population of Salmonella Typhimurium bacteria synergistically with erythromycin. Considering the phenomenon of antibiotic resistance, it is better to use herbal medicines or a combination of herbal medicine and antibiotic instead of using chemicals.

Keywords: Salmonella Typhimurium, Tymasin Plus® Syrup, Real-time PCR, Thymus vulgaris, ALthea officinalis.

**Corresponding author: Hamid Staji*
Address: Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.
E. mail: hstaji@semnan.ac.ir