

بررسی اثر داروی گیاهی کالیک بر عفونت تجربی خوراکی سالمونلا تیفی موریوم در جوجه‌های گوشتی

مأنده تاجی^۱، حمید استاجی^{۲*}، سحر غفاری خلیق^۳، سید حسام الدین عمادی چاشمی^۴

۱- دانش آموخته دانشکده پرديس علوم 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: ۱۴۰۲/۰۴/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۱

چکیده

سالمونلاتیفی موریوم یکی از سروتپ‌های رایج سالمونلا می‌باشد که اغلب با سلامت عمومی و زیان اقتصادی در سطح جهان ارتباط دارد. افزایش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و شیوع سویه‌های مقاوم توجه به داروهای گیاهی و مواد ضد میکروبی طبیعی را بیشتر نموده است. درمان ترکیبی یک استراتژی برای مقابله با مقاومت ضد میکروبی می‌باشد. شربت ضدسرفه تجاری سازی کالیک شامل مواد موثره آویشن‌باغی، شیرین بیان و انیسون می‌باشد. در بروشور شربت کالیک ذکر شده دارای خواص ضد میکروبی و ضد ویروسی است و در درمان مشکلات گوارشی موثر است. هدف از این مطالعه بررسی اثر ضدباکتریایی شربت کالیک و آنتی‌بیوتیک اریترومايسين و هم‌چنین اثر ترکیبی این دو ماده در درمان و کنترل عفونت سالمونلاتیفی موریوم در جوجه‌های گوشتی می‌باشد. در این پژوهش ۴۰ جوجه یک روزه راس ۳۰۸ با سویه استاندارد سالمونلاتیفی موریوم القا عفونت شدند. پس از تلقیح خوراکی باکتری به جوجه‌ها به صورت تصادفی به گروه‌های مساوی ۱- بدون درمان، ۲- درمان با آنتی‌بیوتیک اریترومايسين، ۳- درمان با کالیک و ۴- اریترومايسين و کالیک تقسیم شدند. ۲۴ ساعت پس از القاء عفونت ۵ جوجه از هر گروه در روزهای چهار و دوازده پس از انجام مرگ با ترحم مورد بررسی‌های میکروبیولوژی از طریق شمارش کلنی و آزمون Realtime-PCR کمی و هم‌چنین بررسی‌های هیستوپاتولوژی متعاقب نمونه‌گیری از بافت کبد و طحال و رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین قرار گرفتند. نتایج حاصل از شمارش کلنی و Realtime-PCR در گروه‌های مورد مطالعه نشان داد گروه کنترل بیشترین میزان باکتری را به خود اختصاص داده بود. پس از آن بیشترین میزان باکتری به گروه کالیک و گروه اریترومايسين اختصاص داشت که میزان اختلاف بین این دو گروه معنی دار نبود. در نهایت کمترین میزان باکتری مربوط به گروه درمان با کالیک و اریترومايسين اختصاص داشت. نتایج حاصل از هیستوپاتولوژی نشان داد گروه کنترل بیشترین آسیب به بافت‌ها را داشت و اختلاف معنی‌داری میان گروه کنترل و سایر گروه‌ها مشاهده شد. سایر گروه‌های مورد مطالعه به جز عارضه نکروز کبدی در گروه ترکیب اریترومايسين و کالیک روز دوازده که اختلاف معنی‌داری با سه گروه دیگر داشت، نتایج مشابهی از خود نشان دادند. بر طبق نتایج، داروی گیاهی کالیک عملکرد مشابهی با اریترومايسين دارد و به صورت هم‌افزایی با اریترومايسين در کاهش جمعیت باکتری سالمونلاتیفی موریوم موثر می‌باشد.

کلمات کلیدی: آنتی‌بیوتیک اریترومايسين، سالمونلاتیفی موریوم، شربت کالیک®، گیاهان دارویی، qPCR

*نویسنده مسئول: حمید استاجی

آدرس: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران؛ ایمیل: hstaji@semnan.ac.ir

مقدمه

در ایران به طور عمده، پاتوژن‌های انتروباکتری مانند سروواریهای سالمونلا، شیگلا دیسانتریا و اشریشیا کلی (Staji et al., 2018) به طور معمول پایش می‌شوند. سالمونلا تیفی موریوم یکی از سروتیپ‌های رایج سالمونلا می‌باشد که باعث عفونت دستگاه گوارش انسان و باعث علائم مختلفی در حیوانات آلوده می‌شود (Javan et al., 2012). با این حال، برخی از سویه‌های سالمونلا تیفی موریوم، علاوه بر ایجاد گاستروانتریت موضعی، قادر به ایجاد عفونت‌های سیستمیک هستند این باکتری‌ها در روده کوچک تکثیر می‌شوند و از دیواره روده فراتر می‌روند و به عقده‌های لنفاوی مزانتریک و از آنجا به کبد و طحال می‌رسند و تکثیر می‌شوند (Haimovich and Venkatesan, 2006; Staji et al., 2016). استفاده طولانی مدت و بی‌رویه از این ضد میکروبی‌ها منجر به ایجاد سویه‌های پاتوژن مقاوم به دارو شده است و به همین علت پژوهشگران به دنبال جایگزین‌های مناسب برای آنتی بیوتیک‌ها می‌باشند (Abd El-Hack et al., 2022). متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی به دلیل اثرات ضد میکروبی مانند مکانیسم اختلال در غشا پاتوژن، فعال سازی سلول‌های سیستم ایمنی و ترویج باکتری‌های مهم در روده تاثیر گذار هستند (Diaz-Sanchez et al., 2015). مطالعات زیادی اثرات مفید عصاره و اسانس گیاهی را بر عملکرد طيور ثبت کرده‌اند (Abdelli et al., 2021).

کالیک نام تجاری دارو انسانی و ساخت ایران (محصول شرکت داروسازی نو تک فار) می‌باشد که جهت مواردی چون تسکین سرفه، برونشیت، سرماخوردگی و آنفلوآنزا، به صورت شربت به انسان تجویز می‌گردد. داروی مذکور حاوی عصاره شیرین بیان، آویشن باغی و انیسون می‌باشد که دارای مواد موثره مهمی مانند گلیسیریزین، تیمول و

کارواکرول است. همان‌طور که در بروشور شربت کالیک آمده است به دلیل مواد موثره متفاوت گیاهان به کار رفته در این دارو و اثرات گوارشی آن‌ها، این شربت در گاستریت و پیشگیری و درمان زخم‌های گوارشی نیز سودمند می‌باشد.

گیاه شیرین بیان دارای خواص ضد میکروبی است و بر روی پارامترهای عملکرد، رشد، سلامتی و تخم گذاری طيور معمولاً از طریق مکمل‌های افزودنی خوراک تاثیر می‌گذارد و هضم و اشتها را در جوجه‌های گوشتی بهبود می‌بخشد (Alagawany et al., 2019). در تحقیقی که توسط Reda و همکاران در سال ۲۰۲۱ بر روی بلدرچین ژاپنی صورت گرفت، مشخص شد مکمل شیرین بیان منجر به کاهش قابل توجهی کلیفرم‌ها، اشریشیاکلی و سالمونلا در تعداد کل باکتری‌ها در مقایسه با گروه شاهد شد (Reda et al., 2021). در آزمایش Park و همکاران، نشان داده شد که آمپی سیلین و جنتامایسین که به عنوان یک درمان ترکیبی برای درمان لیستریوز استفاده می‌شوند، اثر هم‌افزایی علیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز نداشت اما حضور ۱ میلی گرم در میلی‌لیتر عصاره شیرین بیان باعث کاهش ۳۲ برابری حداقل غلظت مهاري جنتامایسین شد. علاوه بر این، هم‌افزایی ضد میکروبی با عصاره شیرین بیان، جدایه های بالینی لیستریا مونوسیتوژنز مقاوم به جنتامایسین را نسبت به جنتامایسین حساس کرد (Park et al., 2022). آویشن که دارای مواد موثره تیمول و کارواکرول است بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی اثر ضد باکتریایی دارد (Adam Kowalczyk et al., 2020). نتایج پژوهشی Eslami و همکاران در فعالیت ضد میکروبی اسانس آویشن بر روی جوجه‌های گوشتی نژاد راس آلوده به سالمونلا تیفی موریوم ATCC ۱۴۰۲۸ بعد از هفت روز درمان از طریق گاوژ نشان داد مصرف ۱



جیره آغازین بود که طبق دستور العمل شرکت تولید کننده انجام گرفت. آب نیز بدون محدودیت در اختیار جوجه‌ها قرار گرفت.

تهیه و القا باکتری سالمونلا

القا عفونت ابتدا با سویه استاندارد سالمونلا تیفی موریوم ATCC14028 با دوز عفونی کننده ۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی ۱۰۶ (Colony Forming Unit) CFU باکتری که طی مراحل مقدماتی و در طرحی پایلوت و قبل از انجام آزمون اصلی، که مجدداً اندازه‌گیری شد انجام گرفت. (Lopes et al., 2016) سپس دوز عفونی کننده به‌دست آمده، به‌صورت خوراکی و از طریق گاواژ چینه‌دان به جوجه‌ها (توسط سوند معدی) منتقل گردید و عفونت به‌صورت تجربی در آن‌ها ایجاد شد.

گروه‌های آزمایشی

پس از القا عفونت، جوجه‌ها به‌صورت تصادفی در چهار گروه آزمایشی (هر گروه شامل ۱۰ جوجه) با رنگ آمیزی متمایز شدند. در گروه یک مداخله‌ای در طول دوره آزمایش صورت نگرفت. در گروه دوم پس از گذشت ۲۴ ساعت از القا سالمونلوز در جوجه‌ها، درمان به‌وسیله آنتی بیوتیک اریترومايسين (رویان دارو، سمنان)، با دوز ۰/۲ میلی گرم بر میلی‌لیتر با فاصله ۲۴ ساعت به مدت دوازده روز انجام شد. در گروه سوم تجویز داروی گیاهی کالیک (نوتک فار، تهران) که شامل ترکیبات آویشن، شیرین بیان (شیرین بیان استاندارد شده بر مبنای ۰/۴ میلی گرم در میلی لیتر) و انیسون می‌باشد با دوز ۵۰ میکرولیتر با فاصله ۲۴ ساعت یک بار در طی مدت دوازده روز از طریق گاواژ به جوجه خورانیده شد. در گروه چهارم تجویز کالیک و اریترومايسين به‌صورت خوراکی با دوزهای فوق به‌صورت همزمان صورت گرفت.

میلی‌لیتر اسانس آویشن با دوز ۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر دو بار در روز با فاصله ۱۲ ساعت از رشد سالمونلا تیفی موریوم جلوگیری کرد (Eslami et al., 2022). Du و همکاران نشان دادند که کارواکرول و تیمول در مقابل پاتوژن‌های مهم طيور مانند سالمونلا، اشریشیاکلی و کلستریدیوم پرفرنزنس می‌تواند موثر باشند (Du et al., 2015). در نتایج Mahady و همکاران، نشان داده شد عصاره متانولی دانه‌های انیسون در شرایط آزمایشگاهی از رشد هلیکوباکتر پیلوری جلوگیری کرد. این آزمایش مشخص کرد انیسون می‌تواند یک ترکیب بالقوه مفید در درمان بیماری‌های گوارشی باشد (Mahady et al., 2005).

به خوبی ثابت شده که ترکیبات شربت کالیک مانند تیمول و کارواکرول در آویشن باغی (Adam et al., 2020)، گلیسرین در شیرین بیان (Alagawany et al., 2019) و ترانس آنتول در انیسون (Sun et al., 2019) دارای خواص ضد میکروبی است و تاثیر بسیار زیادی در مشکلات گوارشی دارند. این تحقیق با هدف بررسی داروی گیاهی کالیک و آنتی بیوتیک اریترومايسين و هم‌چنین اثر هم‌افزایی کالیک با اریترومايسين در درمان و کنترل عفونت سالمونلا تیفی موریوم در جوجه‌های گوشتی انجام شد.

مواد و روش

مکان، جامعه و شرایط مورد مطالعه

این مطالعات در دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان انجام شد. در این مطالعه تعداد ۴۰ قطعه جوجه یک روزه نژاد راس ۳۰۸ (کد اخلاق IR.SU.REC.1402.7) با میانگین وزن بین ۹۵ تا ۱۰۰ گرم تهیه شد. محیط نگهداری جوجه‌ها محیطی با درجه حرارت 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد و رطوبت $5 \pm 60\%$ بود. تغذیه جوجه‌ها نیز در سه روز اول جیره پیش آغازین و از سه روزگی به بعد



نمونه گیری

پس از شروع تجویزها در روزهای چهارم و دوازدهم، ۵ جوجه از هر گروه (۵ جوجه برای روز چهارم و ۵ جوجه برای روز دوازدهم) پس از مرگ با ترخم، مورد بررسی‌های میکروبیولوژی از طریق شمارش کلنی در محیط کشت SS آگار (Salmonella Shigella Agar) و بلاد آگار و آزمون Real-Time PCR کمی و هم‌چنین بررسی‌های هیستوپاتولوژی متعاقب نمونه‌گیری از بافت کبد و طحال و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین اتوزین قرار گرفتند.

شمارش بار میکروبی به روش کلنی کانت

بافت‌های کبد و طحال گروه‌های مختلف آزمایشی به گونه‌ای که جمع وزنی بافت‌های هر گروه ۱ گرم باشد برش داده شد و رقت ۱۰۳ تهیه گردید و سپس به جهت کشت باکتری ۱۰۰ میکرولیتر از سه رقت تمام گروه‌های آزمایشی با پنج بار تکرار از هر رقت برداشته شد و به محیط کشت‌ها اضافه گردید و سپس به وسیله پخش کننده شیشه‌ای استریل شده، کشت سطحی داده شد. همین رویه برای تمام گروه‌ها انجام گردید (Zhou et al., 2017). پلیت‌ها با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت و بعد از ۲۴ ساعت شمارش کلنی‌های محیط کشت بلاد آگار و سالمونلا شیگلا آگار (SS) انجام شد.

آزمایش Real Time PCR

ابتدا برای کنترل مثبت از باکتری سالمونلا تیفی موریوم رقت ۰/۱ از نیم مک فارلند (McFarland) تهیه شد و سپس علاوه بر رقت اولیه، رقت سازی به صورت (۱:۱۰)، (۱:۱۰۰)، (۱:۱۰۰۰)، (۱:۱۰۰۰۰) به عنوان ۲، ۳، ۴ و ۵ تهیه گردید و توسط روش فنول-کلروفرم ایزو آمیل الکل استخراج شد و برای کنترل منفی از آب مقطر استفاده شد و نمونه‌ها در جهت کالیره کردن دستگاه Real-

Time PCR در دستگاه قرار گرفتند (Gerivani et al., 2020). پس از این مرحله فرآیند مولکولی ردیابی و تشخیص DNA سالمونلا در بافت‌های کبد و طحال صورت گرفت. ابتدا استخراج DNA به روش فنول کلروفرم ایزو آمیل الکل از بافت کبد و طحال انجام شد (Huang et al., 2021). نمونه‌های بافت کبد و طحال هر مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر لحاظ شدند. بدین ترتیب که ۱۰ میکرولیتر از مخلوط اصلی مستر میکس (Sina Green HS-Qpcr Mix, 2X) Sinaclon (تهران)، ۱ میکرولیتر آغازگر رو به جلو با توالی GCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA مربوط به DNA سالمونلا، ۱ میکرولیتر آغازگر معکوس به توالی GGTAGAAATTCCTCCAGCGGGTACTGG مربوط به DNA سالمونلا و ۳ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استریل در تعداد نمونه‌ها ضرب شد و در میکروتیوپ‌های مخصوص PCR با یکدیگر مخلوط شدند و سپس در میکروتیوپ‌های ۰/۲ میلی‌لیتری توزیع شد و ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده هر نمونه به میکروتیوپ‌ها اضافه و در دستگاه قرار داده شد (Staji et al., 2015; Gerivani et al., 2020). چرخه‌های حرارتی جهت تکثیر DNA سالمونلا در ترموسایکلر Rotor Gene Q (Qiagen Hilden، آلمان) شامل دناتوره شدن اولیه طی ۱ چرخه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۴ دقیقه، دناتوره شدن نهایی ۴۰ چرخه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۳۰ ثانیه و توسعه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۳۰ ثانیه انجام شد. در نهایت توسعه نهایی طی ۱ چرخه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۱۰ دقیقه تمدید شد. در مطالعه حاضر با به کار گرفتن نشانگر فلورسنت سبز به نام سایبر گرین (Sybergreen)



در نهایت با بررسی نتایج میکروبیولوژی حاصل از روش Realtime-PCR و شمارش کلنی در محیط کشت سالمونلا شینگلا آگار (SS) و بلاد آگار و تعیین درجه آسیب وارد شده به بافت‌های کبد و طحال بین گروه‌های مختلف تحت آزمایش، آنالیز آماری با نرم افزار One-way ANOVA با مقیاس ($P < 0.05$) صورت گرفت.

نتایج

شمارش باکتری

نتایج حاصل از شمارش بار میکروبی به روش کلنی کانت در محیط سالمونلا شینگلا آگار (SS) (شکل ۱) و بلاد آگار (شکل ۲) در بافت کبد و طحال در روزهای چهار و دوازده با استفاده از نرم افزار آماری One-Way ANOVA نشان داد که گروه کنترل بیشترین میزان باکتری را به خود اختصاص داده بود و اختلاف معنی‌داری با سایر گروه‌ها داشت. پس از آن به ترتیب گروه آنتی بیوتیک اریترومايسين و گروه داروی گیاهی کالیک اختصاص داشت که میزان اختلاف بین این دو گروه معنی‌دار نبود. در نهایت کمترین میزان باکتری مربوط به گروه چهارم یعنی گروه درمان با ترکیب کالیک و اریترومايسين اختصاص داشت که با گروه‌های دیگر اختلاف معنی‌داری داشت ($P < 0.05$) که این نتایج نشان می‌دهد شربت کالیک توانسته میزان باکتری را نسبت به گروه کنترل کاهش دهد و تاثیری مشابه با گروه درمان آنتی‌بیوتیک اریترومايسين داشته باشد و ترکیب آنتی بیوتیک اریترومايسين و شربت کالیک موفق‌ترین گروه در کاهش میزان باکتری بود.

آزمون Realtime-PCR

قبل از انجام آزمون، رقت سازی از DNA استاندارد در جهت کالیبره کردن دستگاه Real-Time PCR بر اساس چرخه آستانه صورت گرفت که نتایج قابل قبول بود (شکل ۳).

در واکنش، چرخه‌ای از واکنش که در آن محصول مورد نظر ردیابی می‌شود تحت عنوان چرخه آستانه (Cycle threshold) تعیین گردید.

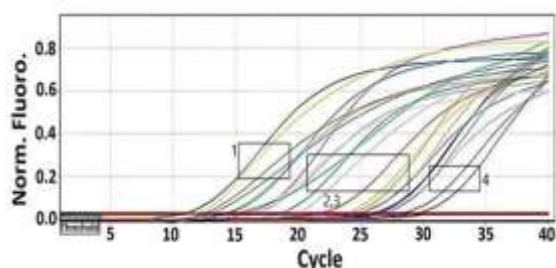
مطالعه هیستوپاتولوژی

مراحل تهیه لام بافتی

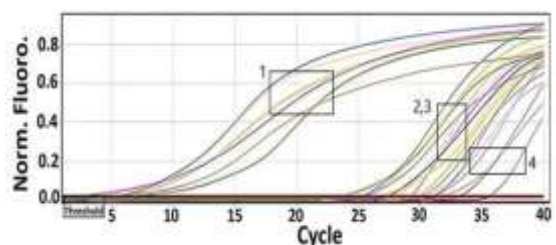
بعد از نمونه گیری با اندازه مناسب از بافت کبد و طحال، نمونه‌ها در ظرف‌های نمونه گیری محتوی محلول فرمالین ۱۰٪ نگهداری شدند و به صورت جداگانه کد گذاری شدند و بعد از گذشت ۲۴ ساعت از جداسازی نمونه‌ها، فرمالین ظرف‌های نمونه گیری مجدداً عوض شدند. در نهایت جهت رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین، ظرف‌های حاوی نمونه بافت کبد و طحال به بیمارستان سینا تهران برای ادامه پروسه که شامل آبگیری (به وسیله الک)، شفاف سازی (به وسیله گزلیل) و آغشته سازی (به وسیله پارافین) و سپس قالب گیری، برش و رنگ آمیزی و در نهایت مونتاژ لام و لامل می‌باشد انتقال داده شدند (Lopes et al., 2016).

بررسی لام‌های رنگ آمیزی شده با هماتوکسیلین ائوزین برای نیمه کمی کردن اطلاعات هیستوپاتولوژی از روش درجه بندی استفاده شد که به صورت تصادفی در چهار شان میکروبی با درشت نمایی یا لنز ۴۰ در پنج لام از هر گروه آزمایشی مورد مطالعه با میکروسکوپ نوری قرار گرفت که دو عارضه نکروز و التهاب در کبد و دو عارضه تخلیه بافتی و هموسیدروزیس در طحال مورد بررسی قرار گرفت. هر عارضه به صورت جداگانه در لام‌ها بررسی گردید به این صورت که اگر در هیچ شان عارضه ای دیده نشد درجه آن ۰ می‌شود و اگر در یک شان عارضه دیده شد درجه آن ۱ و اگر دو شان عارضه دیده شد درجه آن ۲ و اگر در ۳ شان عارضه دیده شد درجه آن ۳ و اگر در ۴ شان عارضه دیده شد درجه آن ۴ می‌شود.

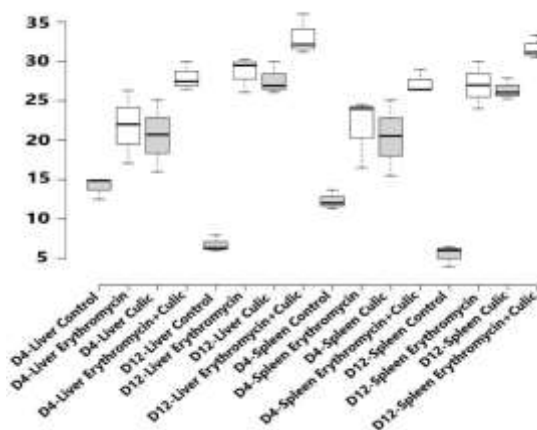




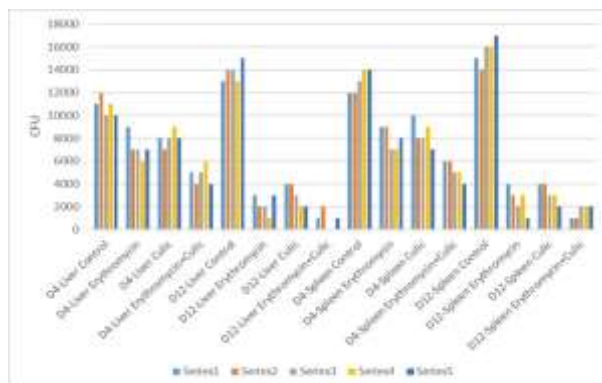
شکل ۴. منحنی‌های مربوط به تکثیر ژنوم سوپه استاندارد سالمونلا تیفی موریوم در نمونه‌های متعلق به گروه‌های مختلف آزمایشی ۱- منحنی‌های گروه کنترل. ۲ و ۳- منحنی‌های گروه درمان اریتروماکسین و گروه درمان کالیک. ۴- منحنی‌های گروه درمان کالیک و اریتروماکسین در روز چهار. تعداد سیکل‌ها روی محور افقی و تغییر فلورسانس دریافتی بر روی محور عمودی نشان داده شده است.



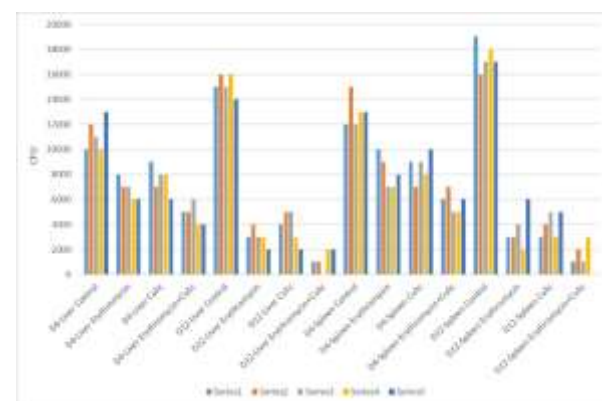
شکل ۵. منحنی‌های مربوط به تکثیر ژنوم سوپه استاندارد سالمونلا تیفی موریوم در نمونه‌های متعلق به گروه‌های مختلف آزمایشی مختلف ۱- منحنی‌های گروه کنترل. ۲ و ۳- منحنی‌های گروه درمان اریتروماکسین و گروه درمان کالیک. ۴- منحنی‌های گروه درمان کالیک و اریتروماکسین در روز دوازده. تعداد سیکل‌ها روی محور افقی و تغییر فلورسانس دریافتی بر روی محور عمودی نشان داده شده است.



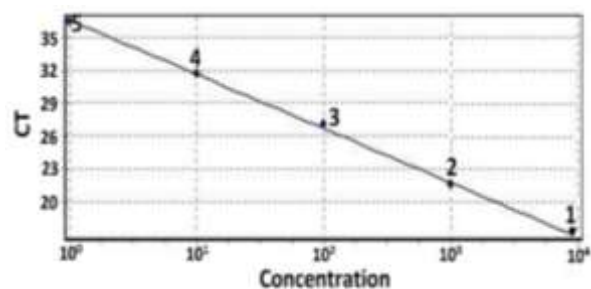
شکل ۶. نمودار گرافیکی مقایسه نتایج آماری اعداد CT در گروه‌های مختلف آزمایشی روز ۴ و ۱۲ که محور افقی بیانگر گروه‌های آزمایشی و محور عمودی بیانگر مقدار چرخه آستانه است.



شکل ۱. نمودار گرافیکی مقایسه آماری نتایج حاصل از شمارش باکتری در محیط کشت بلاد آگار در گروه‌های مختلف آزمایشی روز ۴ و ۱۲ (محور افقی بیانگر گروه‌های مختلف آزمایشی و محور عمودی بیانگر تعداد کلنی باکتری)



شکل ۲. نمودار گرافیکی مقایسه نتایج آماری حاصل از شمارش باکتری در محیط کشت سالمونلا شینگلا آگار (SS) در گروه‌های مختلف آزمایشی روز ۴ و ۱۲ (محور افقی گروه‌های آزمایشی مختلف و محور عمودی بیانگر تعداد کلنی باکتری)



شکل ۳. رقت سازی از DNA کنترل مثبت، انجام آزمون Real-Time PCR و رسم نمودار استاندارد در جهت تنظیم دستگاه. محور افقی بیانگر غلظت و محور عمودی بیانگر چرخه آستانه

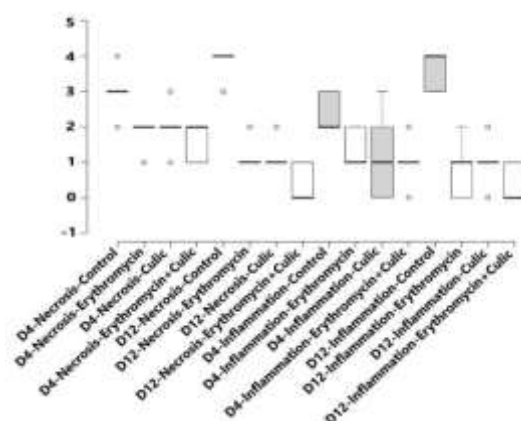
معنی داری مشاهده نشد و بهترین درمان در گروه ترکیب کالیک و اریترومايسين بود که اختلاف معنی داری با سایر گروه‌ها داشت ($P < 0.05$). این نتایج نشان می‌دهد شربت کالیک به صورت هم‌افزایی با اریترومايسين در کاهش جمعیت باکتری سالمونلاتیفی موریوم موثر می‌باشد.

هیستوپاتولوژی

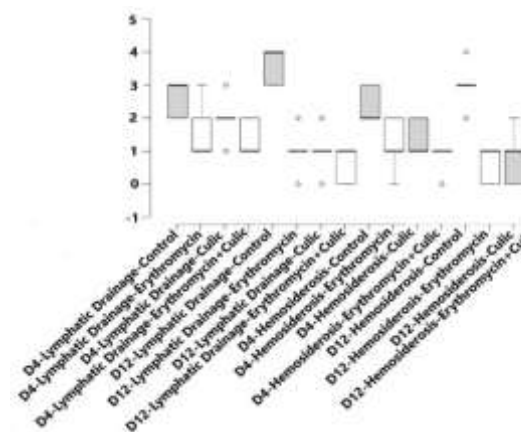
پس از درجه بندی آسیب شناسی دو عارضه نکروز و التهاب کبد (شکل ۷) و دو عارضه تخلیه بافتی و هموسیدروزیس طحال (شکل ۸) در گروه‌های آزمایشی مورد مطالعه، آنالیز با نرم افزار آماری One-way ANOVA صورت گرفت که نشان داد گروه کنترل بیشترین آسیب به بافت کبد و طحال را داشت و اختلاف معنی داری بین گروه کنترل و سایر گروه‌ها مشاهده شد. سایر گروه‌های مورد مطالعه به جز عارضه نکروز کبدی در روز دوازده، نتایج مشابهی از خود نشان دادند و اختلاف معنی داری میان سایر گروه‌ها مشاهده نشد ($P > 0.05$). در مشاهده عارضه نکروز کبدی در ۵ لام از گروه‌های مختلف آزمایشی مشخص شد در روز دوازدهم گروه چهارم که ترکیب آنتی بیوتیک اریترومايسين و داروی گیاهی کالیک بود اختلاف معنی داری با سایر گروه‌ها داشت ($P > 0.05$). بر اساس یافته‌های این مطالعه مشخص شد داروی گیاهی کالیک عملکرد مشابهی با آنتی بیوتیک اریترومايسين دارد که در کاهش عفونت سالمونلایی موثر است.

بحث

در این پژوهش شربت کالیک که شامل مواد موثره گیاهان دارویی آویشن باغی، شیرین بیان و انیسون است به منظور درمان و کنترل عفونت سالمونلا تیفی موریوم در جوجه‌های گوشتی راس ۳۰۸ مورد مطالعه قرار گرفته است که مشاهده شد گروه شربت کالیک توانست به



شکل ۷. نمودار گرافیکی مقایسه نتایج آماری آسیب شناسی نکروز و التهاب بافت کبد در گروه‌های مختلف آزمایشی روز ۴ و ۱۲ که محور افقی بیانگر گروه‌های آزمایشی مختلف و محور عمودی تعیین درجه آسیب شناسی است.



شکل ۸. نمودار گرافیکی مقایسه نتایج آماری تخلیه لنفوسیتی و هموسیدروز بافت طحال در گروه‌های مختلف آزمایشی روز ۴ و ۱۲ که محور افقی بیانگر گروه‌های آزمایشی مختلف و محور عمودی تعیین درجه آسیب شناسی است.

منحنی‌های مربوط به تکثیر ژنوم سویه استاندارد سالمونلاتیفی موریوم در نمونه‌های متعلق به گروه‌های درمانی مختلف دستگاه Realtime-PCR در بافت کبد و طحال روز چهار (شکل ۴) و روز دوازده (شکل ۵) به دست آمد. نتایج آماری در روز چهار و در روز دوازده در بین گروه‌های مورد مطالعه نشان داد (شکل ۶) درمان در گروه داروی گیاهی کالیک صورت گرفته و اختلاف معنی داری با گروه کنترل داشت. در گروه داروی گیاهی کالیک و گروه آنتی بیوتیک اریترومايسين اختلاف

میزان قابل توجهی باکتری سالمونلا تیفی موریوم را نسبت به گروه کنترل کاهش دهد و گروه کالیک اختلاف معنی داری با گروه آنتی بیوتیک اریترومايسين نداشت و گروه ترکیب کالیک و اریترومايسين نتیجه بهتری نسبت به سایر گروه‌ها از خود نشان داد.

در آزمایشی که توسط Staji و همکاران در سال ۲۰۲۰ انجام شد که ۳۲ سر رت نر نژاد ویستار را با استفاده از استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و کریشر وایر استئومیلیت القا و سپس درمان در گروه‌های مختلف آزمایشی آغاز گردید. نتایج بررسی‌ها توسط Realtime-PCR و هیستوپاتولوژی نشان داد که کاهش تعداد باکتری در درجه اول در گروه درمان با اریترومايسين و بزاق زالو و در درجه دوم در گروه اریترومايسين با اختلاف معنی داری نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. هم‌چنین با بررسی مقاطع پاتولوژی اختلاف معنی دار مشخصی از نظر یافته‌های پاتولوژی در گروه درمان با اریترومايسين و بزاق زالو با سایر گروه‌ها وجود داشت. بر اساس یافته‌های این مطالعه مشخص شد که ترکیبات بزاق زالو این توانایی را دارند که به صورت هم‌افزایی با آنتی بیوتیک اریترومايسين در کاهش جمعیت باکتریایی موثر باشند (Gerivani et al., 2020) که طبق پژوهش حاضر که با بررسی Realtime-PCR و هیستوپاتولوژی صورت گرفت شربت کالیک همراه با آنتی بیوتیک اریترومايسين توانست در کاهش جمعیت باکتری سالمونلا تیفی موریوم در جوجه‌های گوشتی به صورت هم‌افزایی موثر باشد. Mi-Hyang lee و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند عصاره اسکیزاندر را به میزان ۵ میلی گرم در موش‌های نر آلوده به سالمونلا تیفی موریوم می‌تواند میزان مرگ و میر و علائم بالینی شدید مانند بی حالی موش‌ها را نسبت به گروه کنترل مثبت کاهش دهد و هم‌چنین آزمایشات هیستوپاتولوژی متعاقب نمونه‌گیری

بافت‌های کبد و طحال و رنگ آمیزی هماتوکسین ائوزین نشان داد گروه درمان با عصاره، آسیب بافتی ناشی از عفونت سالمونلایی را به صورت معنی داری نسبت به گروه کنترل مثبت کاهش می‌دهد. (Lee et al., 2006) همان‌طور که در نتایج هیستوپاتولوژی این پژوهش هم مشاهده شد علائم آسیب شناسی در بافت کبد و طحال جوجه‌هایی که تحت درمان با شربت کالیک برای مقابله علیه عفونت سالمونلا تیفی موریوم قرار گرفتند به طور قابل توجهی نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کردند. آزمایشی که توسط Hyun Ae Kwon و همکاران در سال ۲۰۰۸ در جهت تاثیر ضد میکروبی سه عصاره متانولی کوپتیس جاپونیکا، آلو سیاه و شیساندرا چینسیس در جوجه‌های گوشتی آلوده با استافیلوکوک گالینارم JOL420 انجام شد نشان داد گروه درمان با عصاره‌های گیاهی به ندرت علائم بالینی و آسیب بافتی را در بافت‌هایی مانند کبد، طحال و کلیه از خود نشان دادند و هم‌چنین این ترکیبات اثرات قابل توجهی در مرگ و میر داشتند (Kwon et al., 2008) که نتایج هیستوپاتولوژی این تحقیق هم نشان داد داری گیاهی کالیک که شامل عصاره‌های آویشن و شیرین بیان و انیسون است به میزان قابل توجهی توانست آسیب بافتی ناشی از عفونت سالمونلا تیفی موریوم را در جوجه‌های گوشتی نسبت به گروه کنترل کاهش دهد. در پژوهشی که توسط Lee و همکاران در سال ۲۰۰۳ صورت گرفت مشاهده شد مکمل جیره غذایی جوجه‌های گوشتی به صورت ترکیبی با آویشن می‌تواند عملکرد رشد جوجه‌های گوشتی را بهبود بخشد و شیوع عفونت سالمونلا هایدلبرگ را کاهش دهد و کاندید مناسبی در پیشگیری و درمان آنتریت نکروتیک ناشی از کلستریدیوم پرفرنژنس که یک بیماری روده‌ای در طیور است شود (Lee et al., 2003) که در این پژوهش هم



شربت کالیک که یکی از جزءهای آن آویشن است باعث کاهش عفونت سالمونلایی در جوجه‌های گوشتی شد. در تحقیق دیگری که توسط Cruss و همکاران در سال ۲۰۰۷ انجام شد گزارش کردند که اسانس تیمول و کارواکرول موجود در گیاه آویشن می‌توانند جمعیت سکومی سالمونلا و کمپیلوباکتر ژرونی را در جوجه‌ها کاهش دهند (Cross et al., 2007) که هم‌چنین در بروشور شربت کالیک آمده است این داروی گیاهی شامل مواد موثره تیمول و کارواکرول است که می‌تواند نتیجه گرفت در کاهش عفونت سالمونلایی می‌تواند موثر باشد. آزمایشی توسط Geravand و همکاران در سال ۲۰۲۱، با هدف تاثیر شیرین بیان در جوجه گوشتی یک روزه انجام شد. نتایج نشان داد شیرین بیان می‌تواند هورمون‌های تیروئید را بهبود و جمعیت برخی از باکتری‌های بیماری‌زای بالقوه را در روده جوجه‌های گوشتی کاهش دهد و هم‌چنین مشاهده شد مصرف شیرین بیان تا ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌تواند جایگزینی برای آنتی بیوتیک‌ها در ارتقاء عملکرد رشد جوجه‌های گوشتی باشد (Geravand et al., 2021) که نتیجه این مطالعات بیانگر تاثیر مثبت شیرین بیان بر ویژگی و عملکرد طیور می‌باشد. نتایج آزمایش Al mofleh و همکاران در سال ۲۰۰۷، توسط مطالعه بافت شناسی نشان داد زخم معده حاد در موش‌های صحرایی که توسط مواد شیمیایی مضر مختلفی به جهت درمان با انیسون ایجاد کردند به‌طور قابل توجهی آسیب مخاطی معده ناشی از عوامل نکروز کننده و ایندومتاسین را توانست مهار کند. اثر ضد زخم بیشتر از نظر بافت شناسی تایید شد و سوسپانسیون انیسون تاثیرات زیادی بر روی معده و مخاط معده داشت که نشان دهنده تاثیر انیسون بر مشکلات گوارشی است (Al Mofleh et al., 2007). پژوهشی دیگر توسط Abudabos و همکاران در سال

۲۰۱۶ صورت گرفت که نشان داد مواد افزودنی خوراکی گیاهی مانند فیتوژنیک، اسانس تیمول، انیسون و ... اثری مشابه آنتی بیوتیک آویلامایسین بر رشد و مشخصات بیوشیمیایی جوجه‌های گوشتی داشت. (Abudabos et al., 2016) مطالعه ای توسط Changcheng و همکاران در سال ۲۰۲۲ نشان داد اسانس انیسون ستاره و دارچین می‌تواند به‌طور قابل توجهی عفونت‌های سالمونلا پولورووم و سالمونلا گیو را در جوجه‌های زرد کاهش دهد و هم‌چنین به‌طور قابل توجهی توانست کاهش وزن بدن ناشی از عفونت‌های سالمونلا پولورووم، سالمونلا گیو و سالمونلا کنتاکی را در جوجه‌ها کاهش دهد (Li et al., 2022) که مانند پژوهش حاضر نشان دهنده تاثیر ضد میکروبی انیسون بر عفونت سالمونلا می‌باشد.

اختلاف نتایج هیستوپاتولوژی با آزمون Realtime-PCR و شمارش کلنی در بافت کبد و طحال می‌تواند به این دلیل باشد که تغییرات مولکولی زودتر از تغییرات سلولی حادث می‌شوند و در مطالعات اختلافات بافتی با میکروسکوپ نوری محدودیت وجود دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج ذکر شده می‌توان بیان کرد که داروی گیاهی کالیک در درمان جوجه‌های گوشتی تلقیح شده با سالمونلا تیفی موریوم موثر می‌باشد و ترکیب کالیک و آنتی بیوتیک اریترومایسین بهترین روش مقابله با باکتری سالمونلا تیفی موریوم در مطالعه حاضر است.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

منابع

1. Abd El-Hack, M.E. et al. (2022) "Alternatives to antibiotics for organic poultry production: types, modes of action and impacts on bird's health and production,"



- days of age,” *British poultry science*, 48(4), pp. 496–506. doi: 10.1080/00071660701463221 PMID: 17701503
8. Diaz-Sanchez, S. *et al.* (2015) “Botanical alternatives to antibiotics for use in organic poultry production,” *Poultry science*, 94(6), pp. 1419–1430. doi: 10.3382/ps/pev014 PMID: 25744321
9. Du, E. *et al.* (2015) “In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*,” *Journal of animal science and biotechnology*, 6(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/S40104-015-0055-7 PMID: 26705471
10. Eslami, N., Anzabi, Y. and Nourazar, M.A. (2022) “The Role of *Thymus Vulgaris* Essential Oil on the Rate of Fecal Excretion of *Salmonella Typhimurium* in Broilers Infected with Bacteria,” 6(4), pp. 157–167. doi: 10.22034/JZD.2022.15683
11. Geravand, M. *et al.* (2021) “Growth performance, ascites sensitivity, and ileal microbiota as affected by licorice essential oil in broiler chicken diets,” *Livestock Science*, 251, p. 104670. doi: 10.1016/j.livsci.2021.104670
12. Gerivani Hamid; Rassouli, Maryam; Ghazaleh, Nooshin; Vayeghan, Abbas Javaheri, B.S. (2020) “Co-administration of Erythromycin and Leech Salivary Extract Alleviates Osteomyelitis in Rats Induced by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*,” *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2020/04/30, 33(04), pp. 243–251. doi: 10.1055/s-0040-1703008 PMID: 32356297
13. Haimovich, B. and Venkatesan, M.M. (2006) “*Shigella* and *Poultry Science*, 101(4), p. 101696. doi: 10.1016/j.psj.2022.101696 PMID: 35150942
2. Abdelli, N., Solà-Oriol, D. and Pérez, J.F. (2021) “Phytogenic feed additives in poultry: Achievements, prospective and challenges,” *Animals*, 11(12). doi: 10.3390/ani11123471 PMID: 34944248
3. Abudabos, A.M. *et al.* (2016) “The effect of phytogenic feed additives to substitute in-feed antibiotics on growth traits and blood biochemical parameters in broiler chicks challenged with *Salmonella typhimurium*,” *Environmental Science and Pollution Research*, 23(23), pp. 24151–24157. doi: 10.1007/s11356-016-7665-2 PMID: 27646442
4. Adam Kowalczyk, I.F. and Martyna Przychodna, Sylwia Sopata, A.B. (2020) “Selected Therapeutic Applications,” *Molecules*, (25), pp. 4125–4142. doi: 10.3390/molecules25184125 PMID: 32917001
5. Javan, A.J., Staji, H., Ghazvinian, K., Vayeghan, A.J., Salimi, M.R. and Mahdavi, A., 2012. Prevalence of *Salmonella* spp. in the quail egg interior contents: a provincial study,” *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 6(3), p. 191. doi: 10.22059/IVJM.2012.3007
6. Al Mofleh, I.A. *et al.* (2007) “Aqueous suspension of anise ‘*Pimpinella anisum*’ protects rats against chemically induced gastric ulcers,” *World journal of gastroenterology: WJG*, 13(7), p. 1112. doi:10.3748/wjg.v13.i7.1112 PMID: 17373749
7. Cross, D.E. *et al.* (2007) “The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28



- by a flagellated motile strain of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum,” *Veterinary Journal*, 214, pp. 40–46. doi: 10.1016/j.tvjl.2016.05006 PMID: 27387725
20. Mahady, G.B. *et al.* (2005) “In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders,” *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 19(11), pp. 988–991. doi: 10.1002/ptr.1776 PMID: 16317658
21. Park, M. *et al.* (2022) “Antimicrobial Synergy between Aminoglycosides and Licorice Extract in *Listeria monocytogenes*,” *Pathogens*, 11(4), p. 440. doi: 10.3390/pathogens11040440 PMID: 35456115
22. Reda, F.M. *et al.* (2021) “Dietary effect of licorice (*Glycyrrhiza glabra*) on quail performance, carcass, blood metabolites and intestinal microbiota,” *Poultry Science*, p. 101266. doi: 10.1016/j.psj.2021.101266 PMID: 34225203
23. Staji, H. *et al.* (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), pp. 191–197. PMID: 26697157
24. Staji, H. *et al.* (2016) “Phylogenetic Grouping and Assessment of Virulence Genotypes, With Antibiotic Resistance Patterns, of *Escherichia Coli* Strains Implicated in Female Urinary Tract Infections,” *International Journal of Enteric Salmonella: Death as a means of survival*,” *Microbes and Infection*, 8(2), pp. 568–577. doi: 10.1016/j.micinf.2005.08.002 PMID: 16297650
14. Huang, C. *et al.* (2021) “Development of a rapid *Salmonella* detection method via phage-conjugated magnetic bead separation coupled with real-time PCR quantification,” *Lwt*, 142(January), p. 111075. doi:10.1016/j.lwt.2021.111075
15. Kwon, H.A. *et al.* (2008) “Evaluation of antibacterial effects of a combination of *Coptidis Rhizoma*, *Mume Fructus*, and *Schizandrae Fructus* against *Salmonella*,” *International Journal of Food Microbiology*, 127(1–2), pp. 180–183. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.020 PMID: 18675484
16. Lee, K.-W. *et al.* (2003) “Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens,” *British poultry science*, 44(3), pp. 450–457. doi: 10.1080/0007166031000085508 PMID: 12964629
17. Lee, M.H. *et al.* (2006) “Antibacterial activity of medicinal herb extracts against *Salmonella*,” *International Journal of Food Microbiology*, 111(3), pp. 270–275. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.004 PMID: 16876280
18. Li, C. *et al.* (2022) “The Use of Star Anise-Cinnamon Essential Oil as an Alternative Antibiotic in Prevention of *Salmonella* Infections in Yellow Chickens,” *Antibiotics*, 11(11). doi: 10.3390/antibiotics11111579 PMID: 36358233
19. Lopes, P.D. *et al.* (2016) “Experimental infection of chickens



spice and traditional medicinal herb for both food and medicinal purposes,” *Cogent Biology*, 5(1), p. 1673688. doi:

10.1080/23312025.2019.1673688

Zhou, Z. *et al.* (2017) “Combination of erythromycin and curcumin alleviates *Staphylococcus aureus* induced osteomyelitis in rats,” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(AUG), pp. 1–6. doi: 10.3389/fcimb.2017.00379 PMID: 28884090

Pathogens, 4(1). doi: org/10.17795/ijep31609

25. Staji, H., Birgani, S.F. and Raeisian, 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), pp. 755–762. doi: org/10.1007/s13213-018-1380-9
26. Sun, W., Shahrajabian, M.H. and Cheng, Q. (2019) “Anise (*Pimpinella anisum* L.), a dominant



Effect of Culic[®] Herbal Medicine on Experimental Oral *Salmonella* Typhimurium Infection in Broilers

Maedeh Taji¹, Hamid Staji^{2*}, Sahar Ghaffari Khaligh³, Seyed Hesamodin Emadi Chashmi⁴

1- Graduated from the Faculty of New Sciences and Technologies, 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: 10 June 2024 Accepted: 27 August 2024

Abstract

Salmonella typhimurium is one of the common serotypes of *Salmonella*, which is often associated with public health and economic losses worldwide. Combination therapy is a strategy to deal with antimicrobial resistance. The anti-cough syrup of Culic[®] commercialization includes effective ingredients of *Thymus vulgaris*, *Glycyrrhiza glabra* and *Pimpinella anisum*. Culic[®] syrup has antimicrobial and antiviral properties and is effective in treating digestive problems. The aim of this study is to investigate the antibacterial effect of Culic[®] syrup and the antibiotic erythromycin, as well as the combined effect of these two substances in the treatment and control of *S. typhimurium* infection in broilers. In this study, 40 one-day-old chicks of Ross 308 were infected with the standard strain of *S. typhimurium*. After oral inoculation of bacteria, chickens were randomly divided into equal groups: 1- no treatment, 2- treatment with erythromycin antibiotic, 3- treatment with Culic[®] and 4- erythromycin and Culic[®]. 24 hours after the induction of infection, 5 chickens from each group were subjected to microbiological examinations through colony counting and quantitative Real-Time PCR test and histopathological examinations after hematoxylin-eosin staining. The results of colony counting and Realtime-PCR in the studied groups showed that the control group had the highest bacterial load. After that, the highest bacterial load was assigned to the Culic[®] group and the erythromycin group, and the difference between these two groups was not significant. Finally, the lowest bacterial load was assigned to the treatment group with Culic[®] and erythromycin. The results of histopathology showed that the control group had the most tissue damage and a significant difference was observed between the control group and other groups. Other studied groups showed similar results, except the complication of liver necrosis in the erythromycin and Culic[®] group on the twelfth day, which had a significant difference with the other three groups. Therefore, Culic[®] herbal medicine has the same function as erythromycin and is effective in reducing the population of *S. typhimurium* bacteria synergistically with erythromycin.

Keywords: Antibiotic Erythromycin, *Salmonella Typhimurium*, Culic[®] Syrup, Herbal Medicines, qPCR

* Corresponding Author: Hamid Staji

Address: Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran;

Email: hstaji@semnan.ac.ir