ارزیابی اثرات آنتی‌باکتریال عصاره هیدروالکلی بومادران بر سالمونلاهای دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک جدا شده از سگ‌های اسهالی

ابوالفضل سلیمانی اصل[۱]، مریم کریمی دهکردی[۲*]

چکیده

باکتری سالمونلا یکی از علل اصلی بیماری‌های ناشی از غذا و نگرانی‌های جدی سلامت انسان در سراسر جهان است. انتشار جهانی این باکتری یکی از معضلات در صنعت دامداری است. با توجه به شیوع مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها، در این مطالعه به ارزیابی اثرات ضد باکتریایی عصاره هیدروالکلی بومادران بر سالمونلاهای دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک جدا شده از سگ‌های اسهالی پرداخته شد. دین منظور نمونه مدفوع ۸۳ سگ مبتلا به اسهال به وسیله سواپ سریعا در محیط‌های افتراقی کشت داده شد. پس از تایید جدایه¬های سالمونلا در هر دو روش مولکولی و میکروبی، وجود ژن‌های مقاومت آمینوگلیکوزیدها (aac(3)-IIa و aac(3)-Ia)بررسی گردید. در ادامه اثر ضد باکتریایی عصاره گیاه بومادران و کم‌ترین غلظت مهاری (minimum inhibitory concentration; MIC)بررسی شد. در نهایت نتایج در نرم افزار SPSS نسخه ۲۰، تجزیه و تحلیل شدند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که، میزان شیوع باکتری سالمونلا در نمونه مدفوع سگ‌های اسهالی، ۸/۵ درصد بود. در بررسی MIC در بین گروه‌های مورد سنجش، کم‌ترین غلظت مهاری بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر برای سروارهای واجد ژن‌های aac(3)-Ia، aac(3)-IIa، aac(3)-Ia + aac(3)-IIa و جدایه‌های فاقد ژن مقاومت به ترتیب برابر با ۷۸/۶۶±۲/۳، ۴۶/۲۲±۹/۱، ۶۲/۰۰±۵/۰ و ۹۳/۸±۴۴/۲ بود. در بین این گروه‌ها هیچ تفاوت معناداری مشاهده نشد (p< ۰/۰۵). به عنوان یک نتیجه کلی با توجه به اینکه گیاه بومادران دارای ترکیبات مختلفی است که می تواند تاثیر قوی بر مهار میکروارگانسیم های مختلف داشته باشد. لذا انتخاب راهکارهای درمانی صحیح همچون استفاده از گیاهان دارویی نظیر بومادران می‌تواند در کاهش میزان شیوع و همه گیری بیماری‌های باکتریایی نقش موثری داشته باشد.

واژگان کلیدی: بومادران، سالمونلا، سگ، اسهال، آنتی بیوتیک، ژن مقاومت

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۲/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۵/۱۳

مقدمه

باکتری سالمونلا باسیل‌های گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه‌ها هستند که قادر هستند در روده اکثر مهره داران زنده بمانند (۱). سالمونلاها باکتری‌های مقاومی بوده و طیف وسیعی از pH را تحمل می‌کنند. سالمونلوزیس یکی از بیماری‌های عمده ناشی از حضور این باکتری در مواد غذایی است که منجر به نگرانی در سطح بهداشت عمومی شده است (۲). این بیماری یک تهدید بزرگ برای صنایع دام و طیور است زیرا می تواند از طریق مرگ و میر و کاهش تولید، خسارات اقتصادی سنگینی ایجاد کند. باکتری سالمونلا به‌طور عمده در دستگاه گوارش میزبان‌های متنوعی از جمله پرندگان، گوسفند، گاو، سگ‌سانان و خوک زندگی می‌کند و سبب بروز بیماری در این میزبان‌ها می‌شود (۳). سالمونلاهای غیر تیفوئیدی پاتوژن‌های مهمی هستند که از طریق غذا منتقل می‌شوند و باعث گاستروانتریت، باکتریمی و عفونت‌های کانونی در انسان و حیوانات می‌شوند. انتقال سالمونلا به انسان معمولاً با خوردن گوشت، محصولات لبنی و سایر مواد غذایی آلوده به مدفوع حیوانات یا از طریق آلودگی متقاطع از مواد غذایی آلوده به سالمونلا اتفاق می‌افتد. انتقال سالمونلای غیر تیفوئیدی نیز می‌تواند با قرار گرفتن مستقیم در معرض مدفوع خزندگان، حیوانات خانگی و سایر حیوانات رخ دهد (٤, ٥). سگ‌سانان اهلی و وحشی آلوده فاقد علائم بالینی ممکن است تا ۱۰۰ روز سروتیپ‌های مختلف سالمونلا را در مدفوع خود دفع کنند (۳, ٦). با توجه به حضور تعداد بالای سگ به‌خصوص در مناطق روستایی و با توجه به عدم رعایت بسیاری از نکات بهداشتی در

۱- دانش¬آموخته دکترای حرفه¬ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

*۲- استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
ma_karimivet58@yahoo.com

روستاها و مناطق شهری و تماس نزدیک آن‌ها با انسان، می‌توانند نقش بسیار مهمی در انتقال این باکتری به افراد ایفا کند (۷). استفاده مکرر از عوامل ضد میکروبی مانند بتالاکتاماز، آمینوگلیکوزیدها، سولفونامیدهای تقویت شده و تترا سایکلین‌ها در حیوانات و انسان‌ها، منجر به توسعه مقاومت در موجودات باکتریایی توسط دستیابی به ژن‌های مقاومتی شده است (۸). ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی برای مقاومت در برابر عوامل ضد میکروبی متعددی رمزگذاری می‌شوند. به دلیل اینکه ابتلا به اسهال در حیوانات منجر به ریزش مقدار زیادی مدفوع در مقایسه با حیوان سالم می‌شود، پراکندگی و آلودگی محیطی نیز افزایش پیدا می‌کند که می‌تواند خطر جدی در گسترش سالمونلا با ژن‌های مقاومت باشد (۹). استفاده بیش از حد از آنتی بیوتیک‌ها علیه سروارهای مختلف سالمونلا شایع شده است، منجر به ظهور سروارهای مقاوم به چند دارو (Multi Drug Resistant; MDR)، که یک مشکل بهداشتی حائر اهمیت است، گردیده است. در واقع، تخمین زده می شود که از ۱۰۰ هزار مورد سالمونلوز در سال، تعداد بسیار زیادی از این موارد مربوط به سروارهای MDR است (۱۰). در نتیجه ۹۳۰ پژوهش انجام شده بر روی تجزیه و تحلیل ژنوم سالمونلا، در مجموع ٦٥ ژن مقاومت مختلف یافت شده است که بیشترین فراوانی ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک، مربوط به ژن‌های مقاومت در برابر آمینوگلیکوزیدها بود (٤٠//٧ درصد). این گروه همچنین بیشترین تنوع ژنی را دارند و شامل ۱۸ ژن مختلف هستند که نسبت به آمینوگلیکوزیدها مقاومت نشان می‌دهند. دو مورد از شایع‌ترین این ژن‌ها شامل ***aac(3)-IIa*** و ***aac(3)-Ia*** هستند (۱۱). به‌علاوه، سروارهای تازه‌ای از سالمونلا که از انسان جدا شده‌اند، به سفالوسپورین‌ها، کینولون‌ها، تتراسایکلین‌ها، آمپی‌سیلین و سولفونامیدها مقاوم شده‌اند که منشا آن را در فراورده‌های دامی و به ویژه طیور ردیابی نموده‌اند. با توجه به افزایش چشمگیر مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های مختلف، استفاده از گیاهان با خاصیت ضد باکتریایی بسیار موردتوجه قرارگرفته است که در این بین گیاه بومادران در کنار خواص دارویی دیگر، به‌عنوان یک گیاه با خاصیت بالقوه ضد باکتریایی شناخته‌شده است (۱۲, ۱۳). گیاه بومادران با نام علمی ***Achillea wilhelmsii*** یک گیاه دارویی چندساله متعلق به خانواده‌ای از کمپوزینه با نام محلی گل برنجاس است و ۷ گونه آن منحصرا در ایران یافت می‌شود. این گیاه سرشار از فلاوونوئیدها، سزکویی‌ترپن لاکتون (Sesquiterpene lactone) می‌باشد که دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (١٤-١٦). تاثیرات گیاهان متعددی روی میکرو ارگانیسم‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته و اثر بخشی آن‌ها به اثبات رسیده است، به طوری که مشخص شده است که گیاهان می‌توانند با داشتن ترکیبات مختلف و تاثیر بر سیستم آنتی اکسیدانی و یا سم زدایی سلول‌ها در جهت کاهش آسیب‌ها عمل کنند (۱۷, ۱۸). با این وجود مطالعه جامعی در خصوص اثر مهاری عصاره بومادران روی عوامل بیماریزایی همچون سالمونلا صورت نگرفته است. از آنجایی که مطالعات انجام شده نشان دادند که این گیاه با داشتن ترکیبات مختلف می‌تواند تاثیر قوی بر مهار میکروارگانسیم‌های مختلف داشته باشد، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره هیدروالکلی بومادران بر سالمونلاهای دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک جدا شده از سگ‌های مبتلا به اسهال طراحی شده است.

مواد و روش کار

تهیه عصاره

به منظور تهیه عصاره هیدروالکلی به روش ماسراسیون، در مرحله نخست گیاه بومادران از عطاری خریداری شد و اصالت گیاه درمرکز تحقیق گیاهان دارویی دانشگاه آزاد شهرکرد با نمونه‌های هرباریومی موجود مقایسه و تایید

گردید. پس از تایید اصالت و کیفیت، به وسیله آسیاب برقی پودر و سپس مقدار مناسبی آب به پودر به دست آمده اضافه گردید و در ظرف جداگانه به آن اتانول ۷۰ درصد به نسبت ۱ به ٤ اضافه شد. در مرحله بعد، پس از سه روز به وسیله دستگاه روتاری از محلول به دست آمده عصاره گیری انجام شد و سپس عصاره حاصله به وسیله گرمخانه گذاری خشک و تراشیده شد. در ادامه به کمک نرمال سالین، غلظت های ٤۰۰، ٦۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر از آن تهیه گردید. انتخاب نوع عصاره گیری طبق مطالعات پیشین صورت گرفته است.

جمع‌آوری نمونه

در این پژوهش نمونه مدفوع سگ‌های مبتلا به اسهال ارجاع داده شده به کلینیک‌های دامپزشکی شهرکرد و پناهگاه امید اصفهان مورد بررسی قرار گرفت. به منظور انجام این مطالعه، تعداد ۸۳ نمونه از سگ‌های مبتلا به اسهال مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌گیری به وسیله سواپ صورت گرفت و نمونه‌های اخذ شده به محیط انتقالی کری بلر (محیط کشت بهار افشان، شرکت پارس پیوند، ایران) منتقل گردید و سریعا به آزمایشگاه میکروب‌شناسی منتقل گردید. این نمونه‌ها سپس روی محیط کشت اختصاصی که در ادامه ذکر خواهد شد کشت داده شدند و پس از ٢٤ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه، کلنی‌های رشد کرده به لحاظ مورفولوژی مورد بررسی قرار گرفتند. کلنی‌های مشکوک به باکتری سالمونلا جداسازی و پس از آن با کمک آزمون‌های بیوشیمیایی MR-VP، سیمون سیترات، اوره‌آز، کشت در محیط SIM، کشت روی محیط سه قندی تریپل شوگر آیرون آگار (KIA)- (TSI) جداسازی و سروارهای تایید شده سالمونلا در ازمون‌های بیوشیمیایی، جهت تایید در آزمون PCR نیز بررسی گردید.

بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن

به منظور بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های سالمونلا، از باکتری‌های سالمونلای تایید شده در آزمون میکروبی و مولکولی، تعلیقی با کدورت و چگالی ۰/۵ مک فارلند (حاوی CFU/ml $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ باکتری) ایجاد گردید. در ادامه از آنتی‌بیوتیک‌های توبرامایسین، کانامایسین، جنتامایسین و آمیکاسین به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های خانواده آمینوگلیکوزید جهت بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی استفاده گردید. پس از قرار دادن دیسک‌ها روی محیط مولر هینتون، پلیت را برای مدت ٢٤–۱۸ ساعت در دمای ۳۷±۱ درجه گرمخانه گذاری شد. و در نهایت پس از گذشت این مدت زمان، اندازه ناحیه مهاری مورد بررسی قرار گرفت و براساس استاندارد CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) حساس یا مقاوم بودن جدایه مورد بررسی مشخص گردید (جدول ۱)

جدول ۱– استانداردهای CLSI[1] (mm)

آنتی‌بیوتیک	حساس ***	حساسیت متوسط **	مقاوم *
آمیکاسین	≥۱۷	۱٦–۱٥	≤۱٤
جنتامایسین	≥۱٥	۱٤–۱۳	≤۱۲
کانامایسین	≥۱۸	۱۷–۱٤	≤۱۳
توبرامایسین	≥۱٥	۱٤–۱۳	≤۱۲

[1]CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (2014)

روش تعیین کم‌ترین غلظت مهاری (minimum inhibitory concentration; MIC)

از کشت تازه باکتری سالمونلاهای جدا شده در محیط آبگوشت تریپتوز سوی براث (Tryptic Soy Broth; TSB) کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه و به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق شد، تا کدورتی معادل 10^6 به دست آید. از عصاره بومادران با غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم بر میلی لیتری که پیش از این به روش ماسراسیون تهیه گشته است، رقت‌های سریالی یک دوم، یک چهارم و ... در محیط براث تهیه شد. در ادامه به منظور تعیین MIC از یک پلیت ۹۶ خانه استفاده شد. در هر یک از خانه‌های این پلیت مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف تهیه شده از عصاره (بالاترین رقت مورد استفاده عصاره ۱۰۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود که از آن رقت سریالی تهیه گردید) به علاوه ۱۰۰ میکرولیتر از تعلیق رقیق شده باکتری افزوده شد. همچنین چاهک‌هایی حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط براث به عنوان کنترل منفی و چاهک‌هایی حاوی محیط کشت و باکتری به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. چاهک‌هایی نیز به عنوان شاهد کدورت حاوی ۱۰۰ میکرو لیتر محیط و ۱۰۰ میکرو لیتر از هر رقت در نظر گرفته شد. برای هر نمونه سه بار تکرار در نظر گرفته شد.

روش مولکولی جهت تایید جدایه‌های سالمونلا و شناسایی ژن‌های *aac(3)-Ia* و *aac(3)-IIa*

- استخراج DNA

جهت استخراج DNA باکتری، از روش جوشاندن استفاده شد و DNA استخراج‌شده جهت انجام مراحل بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. به منظور بررسی کمی و کیفی DNA استخراج‌شده، غلظت DNA به وسیله دستگاه نانودراپ (NanoDrop) قرائت گردید.

جدول ۲- پرایمرهای موردنیاز جهت انجام آزمون PCR

پرایمر		توالی پرایمر (۵′ به ۳′)	طول محصول (bp)
پرایمر باکتری سالمونلا	F	ATAATTCGTAGCCCCCAA	۲۸۲
	R	GAAACCCTTCTTCATCAAAC	
پرایمر ژن aac (3)-Ia	F	5′-ATGGGCATC ATTCGCACA-3′	٤٨٤
	R	5′-TCTCGGCTTGAACGAATTGT-3	
پرایمر ژن aac (3)-IIa	F	5′-CGGAAGGCAATAACGGAG-3′	٧٤٩
	R	5′-TCGAACAGGTAGCACTGAG-3	

- آزمون PCR روی نمونه‌ها

مواد مورد نیاز برای انجام PCR شامل: ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس آماده، ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱ میکرولیتر از پرایمرهای فوروارد و ریورس با غلظت ۱۰ پیکومول (جدول ۲) و ۱ میکرولیتر DNA الگو با غلظت ۵۰ ng/µl است. سپس مقدار هر ماده به‌جز DNA ضربدر تعداد نمونه‌های مورد آزمایش شد و در درون میکروتیوب مربوط به مسترمیکس ریخته شد و مقدار ٢٤ میکرولیتر از مسترمیکس تهیه شده، به هر میکروتیوب افزوده شد. در ادامه مقدار یک میکرولیتر از DNA الگو اضافه شد به

طوری که حجم کل محتویات در هر میکروتویوب به ۲۵ میکرولیتر رسید. در میکروتیوب کنترل منفی، مقادیر فوق الذکر منهای DNA ریخته شد و در نهایت نمونه‌ها به دستگاه ترموسایکلر منتقل گردید. پس از انجام PCR روی باکتری‌های مشکوک به سالمونلا، جدایه‌های تایید شده برای این باکتری جهت بررسی ژن‌های مقاومت مورد ازریابی قرار گرفتند . بدین منظور مشابه با آزمون انجام شده روی باکتری‌های جدا شده واکنشی با همان حجم و ترکیبات انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تشخیص ژن‌های مقاومت در جدول ۲ آورده شده است. همچنین برنامه دمایی جهت انجام PCR برای ژن‌های هدف در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳- برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر برای انجام واکنش PCR (سانتی‌گراد)

تعداد سیکل	مرحله	درجه حرارت	زمان
۱	دناتوراسیون اولیه	۹۵	۷ دقیقه
	دناتوراسیون	۹٤	٤٥ ثانیه
۳۵	اتصال	*دمای پرایمر	٤٥ ثانیه
	طویل سازی	۷۲	۱ دقیقه
۱	طویل سازی نهایی	۷۲	۷ دقیقه

*دمای اتصال پرایمر باکتری سالمونلا ۵۳ درجه و پرایمر ژن‌های مقاومت aac(3)-Ia و aac(3)-ILa به ترتیب ۵۱ و ٥٤ می‌باشد.

در پایان به منظور آشکارسازی قطعات تکثیر شده، از ژل آگارز ۱ درصد استفاده گردید و محصول PCR به وسیله ترانس لومیناتور تحت تابش نور UV مشاهده گردید (نگاره ۱).

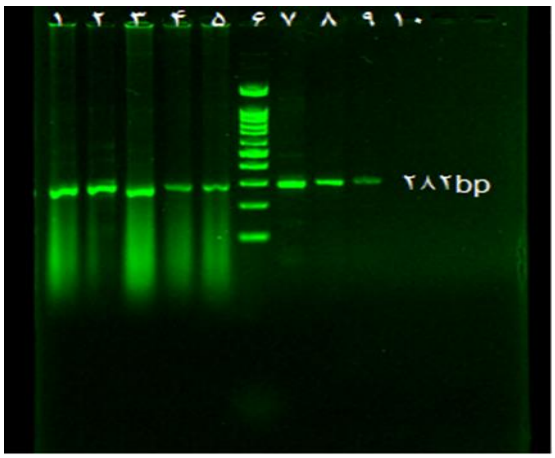
تجزیه و تحلیل داده‌ها

نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ برای بررسی ارتباط داده‌ها به کارگرفته شد. به‌منظور تجزیه‌وتحلیل آماری از آزمون دقیق فیشر و k2 استفاده شد.

نتایج

درصد فراوانی و میزان شیوع باکتری سالمونلا در نمونه مدفوع سگ‌های اسهالی

در ۷ نمونه از ۸۳ نمونه مدفوع موردبررسی، باکتری سالمونلا به روش‌های میکروبیولوژی ردیابی شد و مورد تأیید PCR نیز قرار گرفت. ازاین‌رو میزان شیوع این باکتری ۸/۵ درصد گزارش می‌شود.



نگاره ۱- تصویر ژل PCR از باکتری‌های سالمونلا تایید شده در آزمون PCR، ستون‌های ۱،۲،۳،٤،۵،۷،۸ نمونه‌های مثبت تایید شده در PCR، چاهک ٦ مارکر bp100، چاهک ۹ کنترل مثبت باکتری سالمونلا (S-typhimurium-ATCC 14028, zistroyesh, Iran)، چاهک ۱۰ کنترل منفی. طول محصول PCR تکثیر شده bp282 است.

میزان حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده‌ی آمینوگلیکوزیدها

آنتی‌بیوتیک‌های توبرامایسین، کانامایسین، جنتامایسین و آمیکاسین به‌عنوان آنتی‌بیوتیک‌های خانواده آمینو گلیکوزید مورد سنجش قرار گرفته و نتایج مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها در سه دسته حساس، متوسط و مقاوم دسته‌بندی و در جدول ٤ ارائه شده است. به‌علاوه میزان حساسیت هر جدایه به هر یک از این آنتی‌بیوتیک‌ها در جدول ٥ ذکر شده است.

جدول ٤- وضعیت مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده آمینوگلیکوزید در باکتری‌های سالمونلا جدا شده برحسب درصد

نام آنتی‌بیوتیک	حساس (درصد)	حساسیت متوسط (درصد)	مقاوم (درصد)
آمیکاسین	٢٨/٦	١٤/٣	٥٧/١
جنتامایسین	١٤/٣	٢٨/٦	٥٧/١
کانامایسین	٤٢/٩	٥٧/١	٠
توبرامایسین	٥٧/١	١٤/٣	٢٨/٦

ردیابی ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک در نمونه‌های سالمونلا جدا شده

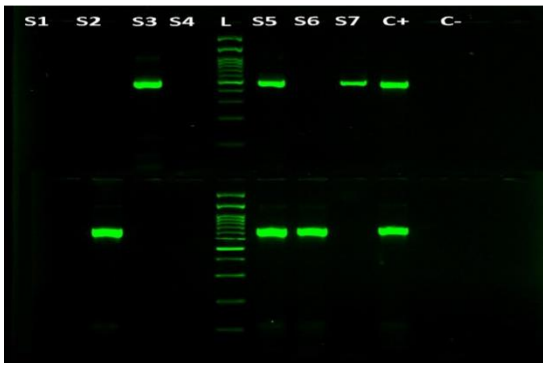
در بررسی وجود یا عدم وجود ژن‌های مقاومت آنزیمی علیه آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلایکوزیدی با نام‌های aac(3)-IIa و aac(3)-Ia و یا وجود هر دو، میزان شیوع این ژن‌ها در ٧ باکتری سالمونلا جدا شده بررسی و نتایج حاصل از آن در جدول ٦ و نگاره ٢ آورده شده است.

جدول ٥- میزان حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده آمینوگلیکوزید در باکتری‌های سالمونلای جدا شده

آنتی-بیوتیک	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧
آمیکاسین	حساس	حساس	حساسیت متوسط	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
جنتامایسین	حساسیت متوسط	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس	مقاوم	مقاوم
کانامایسین	حساسیت متوسط	حساسیت متوسط	مقاوم	مقاوم	حساسیت متوسط	مقاوم	مقاوم
توبرامایسین	حساس	مقاوم	حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم

تأثیرگذاری عصاره گیاه بومادران به روش تعیین کم‌ترین غلظت مهاری (MIC)

اثر ضد باکتریایی عصاره گیاه بومادران با استفاده از روش Broth microdilution و محاسبه کمترین غلظت مهاری (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در باکتری‌های سالمونلا جدا شده، به دست آمد و پس از آنالیز آماری به روش آزمون T غیر وابسته، نتایج در جدول ٧ ارائه شده است.



نگاره ۲- تصویر ژل PCR از ژن‌های مقاومت *aac(3)-Ia* و *aac(3)-IIa* در آزمون PCR ردیف اول مربوط به ژن مقاومت *aac(3)-Ia* و ردیف دوم مربوط به ژن *aac(3)-ILa* است. در هر ردیف، ستون‌های S1-S7 مربوط به ۷ نمونه سالمونلا مثبت هستند. چاهک های L، C+ و C-، به ترتیب مربوط به Ladder، کنترل مثبت و کنترل منفی هستند. چاهک های S3، S5 و S7 نمونه مثبت برای ژن *aac(3)-Ia* و چاهک های S2، S5 و S6 نمونه های مثبت برای ژن *aac(3)-ILa* هستند (S5 مربوط به نمونه ای است که برای هر دو ژن مثبت است).

جدول ٦- شیوع ژن‌های مقاومت علیه آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلایکوزیدی با نام‌های aac(3)-IIa و aac(3)-Ia برحسب تعداد و درصد در ۷ باکتری سالمونلا جدا شده

نام	شیوع برحسب تعداد	شیوع برحسب درصد
aac(3)-Ia	۲ جدایه	۲۸/٦
aac(3)-IIa	۲ جدایه	۲۸/٦
aac(3)-Ia + *aac(3)-IIa*	۱ جدایه	۱٤/۳
عدم وجود ژن‌های مقاومت	۲ جدایه	۲۸/٦

جدول ۷- کم‌ترین غلظت مهاری عصاره هیدروالکلی بومادران برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر علیه باکتری سالمونلا دارای ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی و مقایسه آن با گروه‌های بدون ژن مقاومت.

نام	کم‌ترین غلظت مهاری برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر
aac(3)-Ia	۷۸/۲ ± ٦٦/۳ [a]
aac(3)-IIa	٤٦/۹ ± ۲۲/۱ [a]
aac(3)-Ia + *aac(3)-IIa*	٦۲/٥ ± ۰۰/۰ [a]
عدم وجود ژن‌های مقاومت	۹۳/۸ ± ٤٤/۲ [a]

حروف مشابه در هر سطر نشان دهنده عدم تغییرات معنی-دار می باشد ($p>0/05$).

بحث

گسترش سروارهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک یک مشکل جدی بهداشتی است که حیوانات و انسان‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد. اگرچه در دهه‌های اخیر، اقداماتی برای کاهش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها انجام شده است، ولی سروارهای مقاوم به آنتی بیوتیک هنوز هم چالش مشترک در درمان بیماری‌های انسان و دام در نظر گرفته می‌شود و یک تهدید جدی برای سلامتی است (۱۹, ۲۰). در این راستا، یک موضوع مهم مربوط به شیوع MDR در باکتری‌هایی مانند سالمونلا است که مسئول بیماری‌های ناشی از مواد غذایی در سطح جهان است. در واقع، MDR درمان آنتی‌بیوتیکی

عفونت را دشوار می‌کند و منجر به هزینه های پزشکی بالاتر، بستری طولانی مدت در بیمارستان و مرگ و میر بیشتر می‌شود (۱۰, ۲۱). در چندین منبع، تفاوت در سروارهای MDR بین منابع حیوانی و غذایی نشان داده شده است. با گسترش تجویز و استفاده از آنتی‌بیوتیک ها، ظهور ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها به خصوص سالمونلا که از عوامل اصلی اسهال در سگ‌ها هستند، در حال افزایش است (۲۲). لذا لزوم توجه به رویکردهای درمانی جایگزین به خوبی احساس می شود. علی رغم اینکه در مطالعات گذشته اثرات ضد باکتریایی گیاهان دارویی به ویژه گیاه بومادران به اثبات رسیده است و مشخص گردیده است که گیاهان می‌توانند با داشتن ترکیبات مختلف به خصوص ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدی اثر ضد باکتریایی قابل توجهی از خود نشان دهند، تاکنون مطالعه‌ای در جهت بررسی و مقایسه اثر ضد باکتریایی گیاه بومادران بر روی گونه‌های سالمونلا همراه با ژن مقاومت انجام نشده است. لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ضد باکتریایی گیاه بومادران بر سالمونلاهای دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک جدا شده از سگ‌های اسهالی انجام شد و نتایج حاصل از مطالعه حاضر شیوع ۸/۵ درصدی (۷ نمونه از ۸۳ نمونه) برای این باکتری نشان داد. همچنین در بررسی میزان حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی، بیشترین حساسیت مربوط به آنتی‌بیوتیک توبرامایسین با حساسیت ۵۷/۱ درصدی و کمترین میزان حساسیت مربوط به جنتامایسین با ۱٤/۳ درصد بود. به علاوه میزان شیوع ژن *aac(3)-IIa* و *aac(3)-Ia* در بین ۷ باکتری جدا شده ۲۸/٦ درصد (۲ جدایه برای هر ژن)، شیوع همزمان هر دو ژن aac(3)-Ia و *aac(3)-IIa* ۱٤/۳ درصد بود. همچنین در ۲ جدایه شامل ۲۸/٦ درصد ژن‌های مقاومت مورد بررسی مشاهده نشد. همچنین در بررسی تأثیرگذاری عصاره گیاه بومادران به روش MIC در بین گروه‌های مورد سنجش هیچ تفاوت معناداری مشاهده نشد. علاوه بر مطالعه حاضر در مطالعات مشابه دیگری نیز خواص ضد باکتریایی عصاره بومادران و شیوع ژن‌های مقاومت در سالمونلا نیز مورد بررسی قرار گرفته است که در ادامه به تعدادی از این مطالعات اشاره می‌نماییم. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ توسط Mohammadi و همکاران با هدف بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره متانولی گیاه بومادران بر باکتری‌های بیماری‌زا انجام شد، نشان داده شد که عصاره متانولی گل‌های بومادران رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و اشرشیاکلی را مهار می‌کند. غلظت مهارکننده رشد عصاره برای این باکتری‌ها از ٦ mg/ml تا ۲۵ mg/ml تغییر می‌کند. غلظت µg/ml ۱۰۰۰ عصاره گل‌های بومادران نیز از رشد استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و اشرشیاکلی جلوگیری نمود (۲۳).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۵ توسط Samadi و همکاران انجام شد در بررسی میزان شیوع ژن‌های مقاومت به آنتی-بیوتیک، جدایه‌های سالمونلا دارای بیشترین شیوع مقاومت در برابر کانامایسین (۹/٦ درصد) بودند. ۲٦ جدایه سالمونلا حداقل به ترتیب در برابر یکی از آمینوگلیکوزیدها مقاوم بودند. اما هیچ یک از جدایه‌های سالمونلا ژن‌های مقاومت به آمینوگلیکوزید مورد مطالعه را نداشتند (۲٤). در حالیکه در مطالعه حاضر میزان شیوع ژن *aac(3)-IIa* و *aac(3)-Ia* در بین ۷ باکتری جدا شده ۲۸/٦ درصد (۲ جدایه برای هر ژن) و شیوع همزمان هر دو ژن *aac(3)-Ia* و *aac(3)-IIa* ۱٤/۳ درصد بود و تنها در ۲ جدایه شامل ۲۸/٦ درصد ژن‌های مقاومت مورد بررسی مشاهده نشد. در مطالعه

دیگری که با هدف بررسی ژن‌های مقاومت و ژن SPV پلاسمید در باکتری سالمونلا انجام شد، مشخص گردید که از ۱۰٤ جدایه مورد بررسی، ۵۱ جدایه (٤۹ درصد) نسبت به آمپی سیلین، کلرامفنیکل، استرپتومایسین، سولفونامید و تتراسایکلین مقاوم بودند و همه حاوی یک قطعه ۱/۲۵ کیلو بازی اینتگرون بودند. گروه دوم ۲۸ درصد مقاوم بودند (SSu) و گروه سوم به هر پنج دارو حساس بودند (۱۳ درصد). پلاسمید عامل حدت در ٥٤ جدایه (۹۱/۵ درصد) از ۵۹ جدایه سروار تایفی موریوم یافت شد (٤). علاوه بر مطالعات ذکر شده نتایج حاصل از مطالعه Ebrahimi و همکاران که در سال ۲۰۱۷ انجام شد، مشخص گردید که روغن فرار بومادران در غلظت mg/mL ۵ دارای اثرات بازدارندگی رشد روی باکتری‌های استرپتوکوکوس آگالاکتیه، استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه و استافیلوکوکوس اورئوس هستند (۲۵).

در بررسی کم‌ترین غلظت مهاری، در بین گروه‌های مورد سنجش هیچ تفاوت معناداری مشاهده نشده است (p>۰/۰۵). این بدان معناست که عصاره گیاه بومادران در تمامی باکتری‌های دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی و بدون ژن مقاومت، اثر ضد باکتریایی خود را حفظ کرده و از این رو می‌توان چنین نتیجه گرفت که وجود ژن‌های مقاومت اثر منفی بر خواص ضد باکتریایی بومادران ندارد. به عنوان یک نتیجه کلی می‌توان گفت ظهور مقاومت ضد میکروبی در باکتری‌های مشترک بین انسان و دام پیامدهای عمده‌ای در سلامت عمومی دارد. نتایج حاصل از این مطالعه همراه با مطالعات مشابه نشان می‌دهد که آلودگی حیوانات خانگی به باکتری سالمونلا در کنار ظهور و گسترش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها نشان از بروز یک پدیده بحرانی و تهدید کننده سلامتی در جوامع دامی و به دنبال آن در جوامع انسانی است. پیرامون این مبحث پژوهش‌های دیگری لازم است تا یک جمع‌بندی جامع در خصوص وضعیت آلودگی در میان حیوانات دیگر، وضعیت مقاومت آنتی‌بیوتیکی، و ارزیابی جامع انتقال مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها به دست آید. بنابراین با توجه به موارد ذکر شده، ردیابی و تعیین شیوع ژن‌ها مقاوم دارویی و به کارگیری درمان‌های جایگزین که بتواند بر این مقاومت‌های دارویی غلبه نماید و از شیوع بیشتر این عوامل در حیوانات خانگی و پیرو آن در انسان جلوگیری نماید ضروری به نظر می‌رسد. خوشبختانه در مطالعه فعلی مشخص شد که نه تنها بومادران خواص ضد باکتریایی بر روی باکتری سالمونلا جدا شده از روده سگ‌های اسهالی داشته و از رشد این باکتری جلوگیری می‌کند، بلکه وجود ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی، اثر مهاری معناداری بر روی اثربخشی این گیاه دارویی ندارد. از این رو امید است بتوان از این گیاه به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های خانواده آمینوگلیکوزیدی استفاده کرد.

فهرست منابع

1. Popoff MY, Le Minor LE. Salmonella. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015:1-.
2. Coburn B, Grassl GA, Finlay B. Salmonella, the host and disease: a brief review. Immunology and cell biology. 2007;85(2):112-8.
3. Jiu Y, Meng X, Hong X, Huang Q, Wang C, Chen Z, et al. Prevalence and characterization of Salmonella in three typical commercial pig abattoirs in Wuhan, China. Foodborne Pathogens and Disease. 2020;17(10):620-7.
4. Tauxe RV. Salmonella: a postmodern pathogen. Journal of food protection. 1991;54(7):563-8.
5. Ochiai RL, Wang X, Von Seidlein L, Yang J, Bhutta ZA, Bhattacharya SK, et al. Salmonella paratyphi A rates, Asia.

Emerging infectious diseases. 2005;11(11):1764.
6. Wray C, Wray A. Salmonella in domestic animals. 2000.
7. Wray C, Wray A. Salmonella in domestic animals: Cabi; 2000.
8. Pezzella C, Ricci A, DiGiannatale E, Luzzi I, Carattoli A. Tetracycline and streptomycin resistance genes, transposons, and plasmids in Salmonella enterica isolates from animals in Italy. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2004;48(3):903-8.
9. Molina A, Granados-Chinchilla F, Jiménez M, Acuna-Calvo MT, Alfaro M, Chavarría G. Vigilance for Salmonella in feedstuffs available in Costa Rica: Prevalence, serotyping and tetracycline resistance of isolates obtained from 2009 to 2014. Foodborne Pathogens and Disease. 2016;13(3):119-27.
10. Yukawa S, Uchida I, Tamura Y, Ohshima S, Hasegawa T. Characterisation of antibiotic resistance of Salmonella isolated from dog treats in Japan. Epidemiology & Infection. 2019;147.
11. Rodrigues GL, Panzenhagen P, Ferrari RG, Dos Santos A, Paschoalin VMF, Conte-Junior CA. Frequency of antimicrobial resistance genes in Salmonella from Brazil by in silico whole-genome sequencing analysis: an overview of the last four decades. Frontiers in Microbiology. 2020;11:1864.
12. Gharieb RM, Tartor YH, Khedr MH. Non-Typhoidal Salmonella in poultry meat and diarrhoeic patients: prevalence, antibiogram, virulotyping, molecular detection and sequencing of class I integrons in multidrug resistant strains. Gut pathogens. 2015;7(1):1-11.
13. Alam SB, Mahmud M, Akter R, Hasan M, Sobur A, Nazir KNH, et al. Molecular detection of multidrug resistant Salmonella species isolated from broiler farm in Bangladesh. Pathogens. 2020;9(3):201.
14. Saeidnia S, Gohari A, Mokhber-Dezfuli N, Kiuchi F. A review on phytochemistry and medicinal properties of the genus Achillea. DARU: Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences. 2011;19(3):173.
15. Majnooni M, Mohammadi-Farani A, Gholivand M, Nikbakht M, Bahrami G. Chemical composition and anxiolytic evaluation of Achillea Wilhelmsii C. Koch essential oil in rat. Research in pharmaceutical sciences. 2013;8(4):269.
16. Javidnia K, Miri R, Sadeghpour H. Composition of the volatile oil of Achillea wilhelmsii C. Koch from Iran. 2004.
17. Sin M, Yoon S, Kim Y, Noh E, Seo K, Lee Y. Molecular characteristics of antimicrobial resistance determinants and integrons in Salmonella isolated from chicken meat in Korea. Journal of Applied Poultry Research. 2020;29(2):502-14.
18. Arabi H, Pakzad I, Nasrollahi A, Hosainzadegan H, Jalilian FA, Taherikalani M, et al. Sulfonamide resistance genes (Sul) M in extended spectrum beta lactamase (ESBL) and non-ESBL producing escherichia coli isolated from Iranian hospitals. Jundishapur Journal of Microbiology. 2015;8(7).
19. Sánchez-Salazar E, Gudiño ME, Sevillano G, Zurita J, Guerrero-López R, Jaramillo K, et al. Antibiotic resistance of Salmonella strains from layer poultry farms in central Ecuador. Journal of applied microbiology. 2020;128(5):1347-54.
20. Plumb ID, Schwensohn CA, Gieraltowski L, Tecle S, Schneider ZD, Freiman J, et al. Outbreak of Salmonella Newport infections with decreased susceptibility to azithromycin linked to beef obtained in the United States and soft cheese obtained in Mexico—United States, 2018–2019. Morbidity and Mortality Weekly Report. 2019;68(33):713.
21. Eng S-K, Pusparajah P, Ab Mutalib N-S, Ser H-L, Chan K-G, Lee L-H. Salmonella: a review on pathogenesis, epidemiology and

antibiotic resistance. Frontiers in Life Science. 2015;8(3):284-93.
22. SD A. Warnick LD. Wiedmann M. Antimicrobial resistance in nontyphoidal Salmonella. J Food Prot. 2007;70:780-90.
23. Sichani MM, Amjad L, Mohammadi-Kamalabadi M. Antibacterial activity of methanol extract and essential oil of Achillea wilhelmsii against pathogenic bacteria. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences. 2011;13(3).
24. Samadi N, Pakzad I, Sefidan AM, Hosainzadegan H, Tanomand A. Study of aminoglycoside resistance genes in enterococcus and salmonella strains isolated from ilam and milad hospitals, Iran. Jundishapur journal of microbiology. 2015;8(4).
25. Ebrahimi Kahrizsangi A, Habibian Dehkordi S, Hakimi Alni R, Dokhtfaraj M, Hemati M. Investigation of antibacterial activity of essential oil from arial part of Achellia millefolium against some gram-positive bacteria isolated from bovine mastitis in Shahrekord district. Veterinary Researches & Biological Products. 2017;30(3):78-84.