"Research article" DOI: 10.30495/JVCP.2023.1968710.1385

A comparative study of the antibacterial effect of purified *Lactobacillus acidophilus*, cephalexin, and garlic essential oil on the predominant bacteria causing otitis in dogs of Urmia city

Sadeghi-zali, M.H.

Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.
*Corresponding author's email: sadeghi.mohamadhosein@yahoo.com
(Received: 2023\2\17 Accepted: 2023\8\1)

Abstract

This study compared the effectiveness of purified *Lactobacillus acidophilus (ATCC4356)*, cephalexin, and garlic essential oil on the predominant bacteria causing otitis in dogs of Urmia city. For this purpose, 102 samples (50 male and 52 female animals) were taken from dogs affected by otitis media. The results indicated that in 90 cases (88.24%), the infection was due to bacterial otitis of which *Staphylococcus aureus* (22.5%), *Streptococcus pneumoniae* (18.6%) and *Pseudomonas aeruginosa* (14.7%) were isolated as the predominant otitis causing bacteria respectively and 12 samples (11.76%) had non-infectious otitis. It was also found that purified *Lactobacillus acidophilus* and garlic essential oil were able to inhibit the growth of predominant otitis causing bacteria almost as much as cephalexin although the inhibition of *Staphylococcus aureus* growth was significantly more than *Streptococcus pneumoniae* ($p<0.05$). Also the mean minimum inhibitory concentration and bactericidal concentration of *Staphylococcus aureus* under the influence of purified *Lactobacillus acidophilus*, garlic essential oil, and cephalexin, as well as the combination of purified *Lactobacillus acidophilus* + garlic essential oil and purified *Lactobacillus acidophilus* + cephalexin were non-significantly lower than that for *Streptococcus pneumonia*. The minimum inhibitory concentration and bactericidal concentration of garlic essential oil + cephalexin was the same for both bacteria.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Cephalexin, Garlic oil, *Lactobacillus acidophilus* filter, Otitis.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2023.1968710.1385

بررسی مقایسه‌ای اثر ضدباکتریایی پالیده *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، آنتی‌بیوتیک سفالکسین و اسانس سیر (*Allium sativum*) بر باکتری‌های غالب ایجادکننده اوتیت در سگ‌های شهرستان ارومیّه

محمدحسین صادقی‌زالی*

استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: sadeghi.mohamadhosein@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۱۱/۲۸ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۵/۱۰)

چکیده

مطالعه حاضر جهت مقایسه اثر بخشی پالیده *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (ATCC:4356)، آنتی‌بیونیک سفالکسین و اسانس سیر بر باکتری‌های غالب ایجادکننده اوتیت در سگ‌های شهرستان ارومیّه انجام گردید. بدین منظور نمونه‌گیری از موارد عفونت گوش میانی تعداد ۱۰۲ قلاده سگ (۵۰ نمونه مربوط به سگ‌های جنس نر و ۵۲ نمونه مربوط به سگ‌های جنس ماده) انجام شد. نتایج نشان داد که از ۹۰ نمونه، به عنوان اوتیت‌های باکتریائی عفونی (۸۸/۲۴ درصد موارد)، به ترتیب *استافیلوکوکوس اورئوس* (۲۲/۵ درصد)، *استرپتوکوکوس پنومونیه* (۱۸/۶ درصد) و *سودوموناس آئروژینوزا* (۱۴/۷ درصد) جدا گردید. ۱۲ نمونه (۱۱/۷۶ درصد موارد) هم مربوط به اوتیت‌های غیرعفونی بود. همچنین مشخص گردید که پالیده *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و اسانس سیر توانستند رشد باکتری‌های غالب ایجادکننده اوتیت در سگ‌های شهرستان ارومیّه را تقریباً به اندازه آنتی‌بیونیک سفالکسین، مهار نمایند که در این بین ممانعت از رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به *استرپتوکوکوس پنومونیه* به‌طور معنی‌داری، بیشتر مشاهده گردید ($p<0/05$). همچنین میانگین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد و حداقل غلظت کشندگی در مورد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تحت تاثیر پالیده *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، اسانس سیر، آنتی‌بیوتیک سفالکسین و همچنین ترکیب پالیده *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* با اسانس سیر و نیز پالیده *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* با آنتی‌بیونیک سفالکسین، به‌طور غیرمعنی‌داری کمتر از فاکتورهای مذکور، در مورد *استرپتوکوکوس پنومونیه* بود. همچنین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد و غلظت باکتری‌کشی ترکیب اسانس سیر و آنتی‌بیوتیک سفالکسین بر روی هر دو باکتری مذکور، یکسان بود.

کلیدواژه‌ها: اسانس سیر، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، سفالکسین، اوتیت سگ، شهرستان ارومیه.

مقدمه

امروزه به دلیل گسترش روز افزون استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌ها، شاهد گسترش بیش از حدّ باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها هستیم. بنابراین، استفاده از ترکیبات جایگزین، پیشنهاد مناسبی جهت رفع این قبیل مشکلات می‌باشد. *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (*Lactobacillus acidophilus*) گونه‌ای از باکتری‌های گرم مثبت بی‌هوازی اختیاری و دارای متابولیسم تخمیری است که از طریق تخمیر قندها انرژی کسب می‌کند و به راحتی در pH نسبتاً پایین (حدود ۵ و کمتر) رشد می‌کند و دمای رشد مطلوب آن هم حدود ۳۷ درجه سلسیوس می‌باشد (Kefili *et al*., 2010).

باکتری مذکور به طور طبیعی در دستگاه گوارش و دهان انسان و حیوانات وجود دارد و برخی از سویه‌ها ممکن است دارای ویژگی‌های پروبیوتیکی باشند که سویه‌های فوق به صورت تجاری در بسیاری از محصولات لبنی، گاهی همراه با *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* استفاده می‌شوند (Kullen *et al*., 2002).

سفالکسین آنتی‌بیوتیکی است که برای درمان شماری از عفونت‌های باکتریایی به‌کار می‌رود. این دارو، خوراکی است و علیه باکتری گرم مثبت و باکتری گرم منفی فعالیّت می‌کند (Akimoto *et al*., 1990). این دارو در گروه نسل اول سفالوسپورین‌ها قرار می‌گیرد و فعالیّتی مشابه به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام دارد و شامل عامل درون وریدی سفازولین نیز می‌شود (García Perdomo *et al*., 2022).

سیر با نام علمی *Allium sativum* گونه‌ای از جنس پیاز (Allium) است که سابقه چند هزار ساله دارد. سیر گیاه بومی آسیای مرکزی و شمال شرق ایران است. این گیاه به عنوان طعم دهنده غذا و به عنوان یک دارو برای درمان در راستای طب سنّتی استفاده می‌شود (Allium sativum, 2017).

اوتیت از گروه بیماری‌های التهابی گوش میانی است (Qureishi *et al*., 2014). دو نوع اصلی اوتیت عبارتند از: اوتیت حاد گوش میانی و اوتیت گوش میانی با تجمع مایع مزمن (Alberti *et al*., 2000). عفونت گوش میانی به صورت ناگهانی آغاز می‌شود و معمولاً با درد شدید گوش همراه است.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر روی ۱۰۲ قلاده سگ خیابانی در بهار ۱۴۰۰ در شهرستان ارومیه انجام گرفت. بدین منظور جهت نمونه‌برداری از موارد مشکوک به اوتیت، پس از ضدعفونی کردن گوش خارجی با الکل ۷۰ درجه، از ترشحات گوش میانی به وسیله سوآپ پنبه‌ای استریل نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها بعد از اخذ، در سریع‌ترین زمان ممکن در داخل محیط ترانسپورت به آزمایشگاه میکروب‌شناسی جهت تعیین هویّت باکتری‌های احتمالی عامل اوتیت ارسال شدند. پس از طیّ روند تشخیصی باکتری‌ها و تعیین هویّت آن‌ها ، جدایه‌ها در میکروتیوب‌های حاوی گلیسرول و محیط کشت مایع عصاره قلب و مغز ، در دمای ۱۸- درجه سلسیوس نگه‌داری شدند.

- احیاء باکتری‌های غالب جداشده از موارد اوتیت: در این مرحله از مطالعه، از بین جدایه‌های فریزشده، باکتری‌هائی که تعداد بیشتری را به خود اختصاص داده بودند، جهت احیاءشدن، در محیط کشت BHI آگار با

استفاده از آنس حلقوی کشت خطی داده شده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند تا کشت تازه از آن‌ها حاصل شود.

- **تهیّه سوسپانسیون باکتریائی از جدایه‌های مرحله قبل:** جهت تهیه سوسپانسیون باکتریایی لازم، ابتدا از کشت تازه جدایه‌های استافیلوکوکوس کوآگولاز مثبت و *استرپتوکوکوس پنومونیه* که در مرحله قبل تهیه شده‌بود، جداگانه به سطح محیط BHI agar منتقل گردیده و کشت خطی منطقه‌ای داده‌شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شدند تا این‌که از جدایه‌های مذکور، پرگنه‌های خالص جدا و تک به‌دست آید. در ادامه ۴ یا ۵ تک پرگنه تشکیل‌شده را با استفاده از آنس حلقوی استریل، به یک لوله آزمایش استریل حاوی ۵ میلی‌لیتر از سالین فیزیولوژیک استریل منتقل نموده و به خوبی با عمل تکان دادن، مخلوط همگن تهیه شد. سپس کدورت موجود در لوله مذکور با کدورت لوله شماره ۰/۵ استاندارد مک‌فارلند به صورت چشمی و در زیر نور چراغ مطالعه و در مقابل یک صفحه سفید با خطوط سیاه مشخص و مقایسه گردید و با اسپکتروفتومتر جذب نوری آنها در طول موج ۶۲۵ nm اندازه‌گیری شد. عدد مورد قبول جذب نوری بین (۰/۱-۰/۰۸) می‌باشد.

- **تهیّه پالیده از باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*:** بدین منظور، از محتویات کشت لیوفیلیزه باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (ATCC:4356)، خریداری‌شده از مرکز مجموعه میکروارگانیسم‌های صنعتی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (تهران- ایران)، در شرایط استریل در محیط MRS broth کشت داده شده و به مدت ۷۲ ساعت در شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شد. بعد از این مدّت، از رسوب ایجادشده از باکتری مذکور، در ته لوله دیگری که حاوی ۵ میلی‌لیتر از محیط MRS broth بود، کدورتی مشابه کدورت مک فارلند ایجاد کرده و دوباره به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و در شرایط بی‌هوازی گرم‌خانه-گذاری گردید. سپس محتویات لوله مذکور، به مدّت ۱۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ شد. در نهایت، پس از حذف مایع رویی، قسمت رسوب حاصله از باکتری، بعد از عمل استریل‌کردن با استفاده از فیلتر میلی‌پور با اندازه ۰/۲۲ میکرون، به یک لوله آزمایش استریل منتقل گردید.

- **آماده‌سازی رقت‌های مورد نظر از ترکیبات مورد آزمایش:** بدین منظور از روش تهیه رقت‌های سریال استفاده گردید، به‌طوری‌که در مورد اسانس سیر، دی‌متیل سولفوکسید ۱۰ درصد (DMSO)، در مورد آنتی‌بیوتیک سفالکسین، آب مقطر استریل و در مورد پالیده باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، سرم فیزیولوژی استریل، به عنوان حلال و تعداد ۱۰ عدد لوله استریل جهت تهیه رقت‌های لازم، بکار گرفته‌شد. برای تهیه رقت‌های لازم از هر یک از ترکیبات فوق، در لوله اول، ۱ میلی‌لیتر و در لوله‌های بعدی آن ۰/۵ میلی‌لیتر از حلال مربوطه ریخته می‌شد. همچنین مقدار ۵۱۲ میلی‌گرم از اسانس خالص، آنتی‌بیوتیک محلول در ۲ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۰/۰۲ مولار و نیز پالیده فیلترشده باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، به‌طور جداگانه در لوله اول ریخته شده و بعد از تکان دادن، ۰/۵ میلی‌لیتر از محتویات لوله اول به لوله دوم و به

همین ترتیب از محتویات لوله دوم به لوله سوم و تا به لوله دهم، انتقال داده می‌شد و در نهایت هم ۰/۵ میلی‌لیتر از محتویات لوله دهم به بیرون ریخته‌شد.

- **تعیین حداقل غلظت مهار از رشد (Minimum Inhibition Concentration; MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (Minimum Bactericidal Concentration; MBC) ترکیبات مورد مطالعه**: بدین منظور از روش میکرودایلوشن براث و پانل پلی‌استیرن سترون ۹۶ چاهکی (میکروپلیت ۹۶ خانه) استفاده گردید به‌طوری‌که ابتدا به میزان ۱۶۰ میکرولیتر از محیط کشت مولرهینتون براث، سپس به‌میزان ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های تهیّه‌شده از اسانس سیر، آنتی‌بیوتیک سفالکسین و پالیده باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (در حالت ترکیبی این مقدار به ۱۰ میکرولیتر تغییر می‌یابد) و درنهایت به میزان ۲۰ میکرولیتر از تلقیح باکتریایی به چاهک‌های میکروپلیت افزوده شد. بدین ترتیب حجم محتویات در چاهک‌ها به ۲۰۰ میلی‌لیتر و با توجه به ایجاد رقت ۰/۱ در چاهک‌ها غلظت مواد در چاهک‌ها ۱۰ برابر رقیق شده و تعداد تقریبی باکتری‌ها در چاهک‌ها هم به 5×10^5 CFU/ml رسید. برای کنترل منفی (رشد باکتری‌ها)، ۱۸۰ میکرولیتر مولرهینتون براث همراه با ۲۰ میکرولیتر از تلقیح‌های باکتریایی به چاهک‌ها افزوده شد. میکروپلیت پس از درپوش‌گذاری به مدت ۲۰ دور بر ثانیه در دستگاه ترموشیکر پلیت تکان داده شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در شرایط هوازی گرم‌خانه‌گذاری شد. پس از این مرحله، محتویات چاهک‌ها به صورت چشمی از نظر ایجاد یا عدم ایجاد کدورت مورد بررسی قرارگرفته و اولین چاهک شفاف MIC و دومین چاهک شفاف MBC درنظرگرفته شد. سپس برای تایید، به میزان ۱۰ میکرولیتر از اولین چاهک شفاف، همراه با یک چاهک شفاف مجاور آن برداشته و به‌صورت سطحی در آگار مغذی کشت داده شد. این کار در مورد اسانس سیر، سفالکسین و پالیده باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به تنهایی و در حالت ترکیبی نیز انجام گردید.

- **نحوه تعیین حساسیت جدایه‌ها نسبت به ترکیبات مورد آزمایش به‌روش انتشار دیسک برروی آگار**: بدین منظور ابتدا از کشت ۱۸ ساعته جدایه‌های *استافیلوکوکوس* کوآگولاز مثبت و *استرپتوکوکوس پنومونیه*، سوسپانسیون میکروبی با کدورتی معادل کدورت لوله شماره ۰/۵ استاندارد مک فارلند تهیه شده و سپس به مقدار لازم از آن با استفاده از سواپ سترون بر روی محیط کشت مولرهینتون آگار به‌روش یکنواخت تلقیح گردید. سپس دیسک‌های بلانک سترون به قطر ۶ میلی‌متر که جداگانه با مقدار ۱۰ میکرولیتر از اسانس سیر، آنتی‌بیوتیک سفالکسین و پالیده *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* آغشته شده‌بودند، با فواصل مناسب، بر سطح محیط مولرهینتون آگار، جایگذاری شد. به‌عنوان کنترل‌های منفی آزمایش هم از ۲ دیسک بلانک سترون که جداگانه آغشته به مقدار ۱۰ میکرولیتر از آب‌مقطر استریل و حلال DMSO شده‌بودند، استفاده گردید. سپس محیط‌های فوق در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد. بعد از اتمام زمان گرمخانه‌گذاری، قطر منطقه عدم رشد در اطراف هریک از دیسک‌های مورد آزمایش، در زیر نور مطالعه و با استفاده از خط‌کش دقیق اندازه‌گیری شده و برحسب میلی‌متر ثبت گردید.

- **تحلیل آماری داده‌ها**: تحلیل آماری داده‌های حاصله با استفاده از نسخه ۲۲ نرم‌افزار SPSS (IBM SPSS Statistics، شرکت شیکاگو، IL، USA) انجام شد. ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف و سپس همگنی واریانس داده‌ها با آزمون لون بررسی شد. در مرحله بعد برای داده‌های با توزیع نرمال با استفاده از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه و آزمون تکمیلی توکی اختلاف میانگین میزان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد (MIC)، حداقل غلظت کشندگی (MBC) و قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس پنومونیه* بر حسب تیمارهای مورد مطالعه، بررسی گردید. همچنین جهت مقایسه میانگین قطر هاله مهاری رشد، حداقل غلظت بازدارندگی از رشد و حداقل غلظت کشندگی متاثر از تیمارها روی میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه از آزمون تی استیودنت (*t*- student) برای گروه‌های مستقل استفاده گردید. لازم به ذکر است در تمامی مراحل تجزیه و تحلیل، خطای مجاز برای رد فرض صفر (H_0)، ۵ درصد در نظر گرفته شد و برای کاهش خطا، آزمایشات در ۳ تکرار انجام گردید. همچنین رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۳ صورت گرفت.

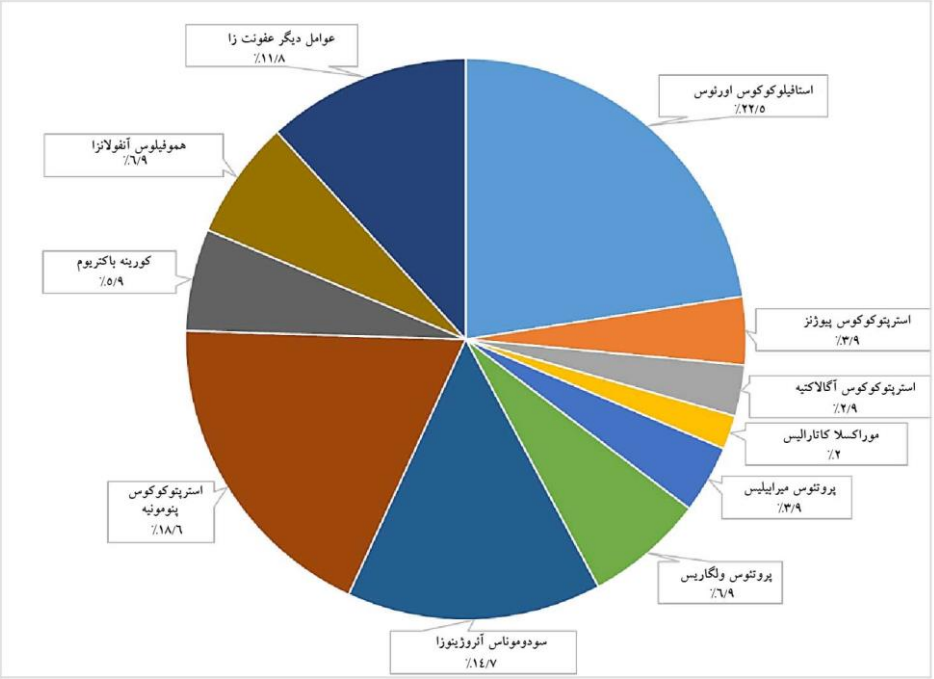
یافته‌ها

- **یافته‌های توصیفی**: با توجه به نتایج توصیفی مندرج در جدول ۱ ملاحظه می‌گردد که از ۱۰۲ نمونه عفونت گوش میانی مورد مطالعه در سگ‌های شهرستان ارومیه، تعداد ۵۰ نمونه مربوط به جنس نر و ۵۲ نمونه مربوط به جنس ماده بودند.

جدول ۱- فراوانی مطلق و نسبی جنسیّت سگ‌های مورد مطالعه

جنسیت سگ	فراوانی مطلق (تعداد)	فراوانی نسبی (درصد)
نر	۵۰	۴۹
ماده	۵۲	۵۱
	۱۰۲	۱۰۰

همچنین نتایج کشت باکتریایی بر روی ۱۰۲ نمونه عفونت گوش میانی اخذشده ازسگ‌های مورد آزمایش شهرستان ارومیه حاکی است که در ۹۰ نمونه (۸۸/۲۴ درصد) علّت اوتیت باکتریایی بوده و در ۱۲ مورد هم (۱۱/۷۶ درصد)، عوامل دیگری باعث ایجاد عفونت در گوش میانی شده‌بودند. مطابق یافته‌های ارائه شده در نمودار ۱ هم، بیشترین باکتری‌های مولد عفونت گوش میانی در سگ‌های شهرستان ارومیّه، به‌ترتیب *استافیلوکوکوس اورئوس* (۲۲/۵ درصد)، *استرپتوکوکوس پنومونیه* (۱۸/۶ درصد) و *سودوموناس آئروژینوزا* (۱۴/۷ درصد) بودند.



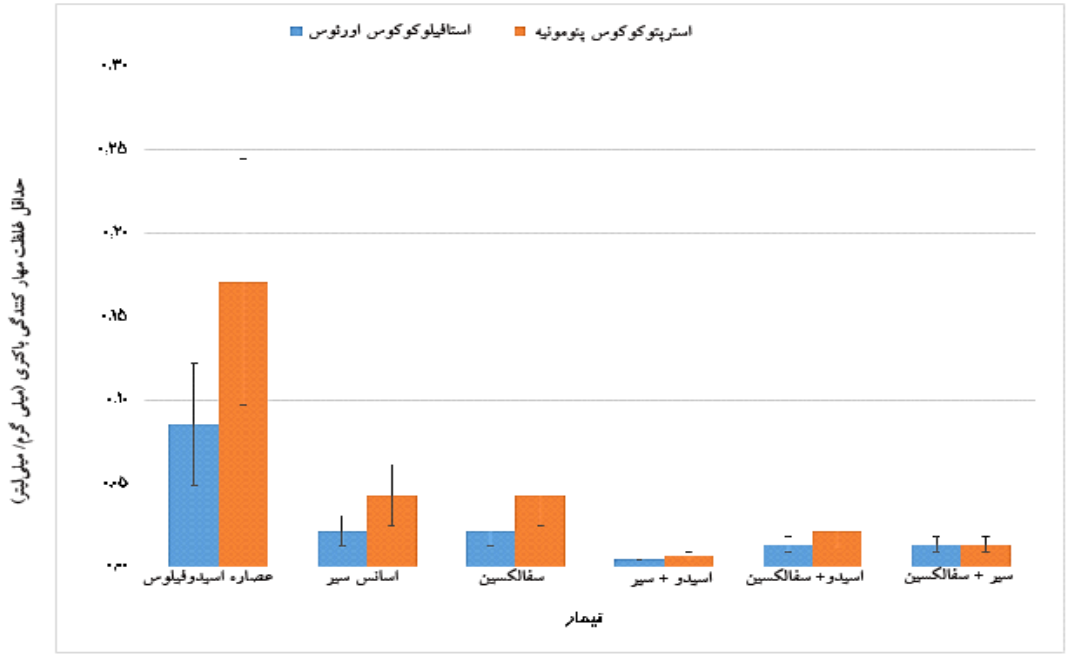
نمودار ۱- فراوانی نسبی باکتری‌های مولد عفونت گوش میانی در سگ‌های شهرستان ارومیه

- نتایج حاصله از تعیین حساسیت جدایه‌ها نسبت به ترکیبات مورد آزمایش به‌روش انتشار دیسک بر روی آگار: از طرف دیگر مطابق یافته‌های ارائه‌شده در نمودار ۲، مشخص گردید که درخصوص میزان میانگین منطقه مهار رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، متأثر از پالیده لاکتوباسیلوس *اسیدوفیلوس*، اسانس سیر، آنتی‌بیوتیک سفالکسین و حالت‌های ترکیبی آن‌ها، بیشترین مقدار مربوط به تیمار با ترکیب پالیده لاکتوباسیلوس *اسیدوفیلوس* و اسانس سیر (۲۲/۰±۳۳/۵۷ میلی‌متر) و کمترین مقدار هم مربوط به تیمار به تنهائی با پالیده لاکتوباسیلوس *اسیدوفیلوس* (۱۳/۰±۶۶/۵۷ میلی‌متر) بوده‌است. جهت مقایسه قطر منطقه مهار رشد باکتری مورد مطالعه در اطراف چاهک-های تیمارشده با پالیده *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، اسانس سیر، آنتی‌بیوتیک سفالکسین و حالت‌های ترکیبی آن‌ها هم، از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه و آزمون تکمیلی توکی استفاده گردید که نتایج حاصله حاکی است، میانگین قطر هاله مهاری رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* تحت تاثیر اسانس سیر، آنتی بیوتیک سفالکسین و همچنین پالیده *اسیدوفیلوس*+سفالکسین به‌طور غیرمعنی‌داری بیشتر از *استرپتوکوکوس پنومونیه* بوده، لیکن پالیده *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و همچنین پالیده *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* + اسانس سیر توانست به‌طور معنی‌داری از رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به *استرپتوکوکوس پنومونیه* ممانعت بیشتری نماید ($p<۰/۰۵$). لازم به ذکر است که سطح معنی‌داری در این خصوص، در مورد پالیده *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*= ۰/۰۱۱، اسانس سیر= ۰/۱۰۱، آنتی‌بیوتیک سفالکسین= ۰/۴۲۲، پالیده + اسانس سیر=

۰/۰۱۳، پالیـــده + سفالکســـین= ۰/۲۳۰ و ســـیر + سفالکسین= ۱ بود.

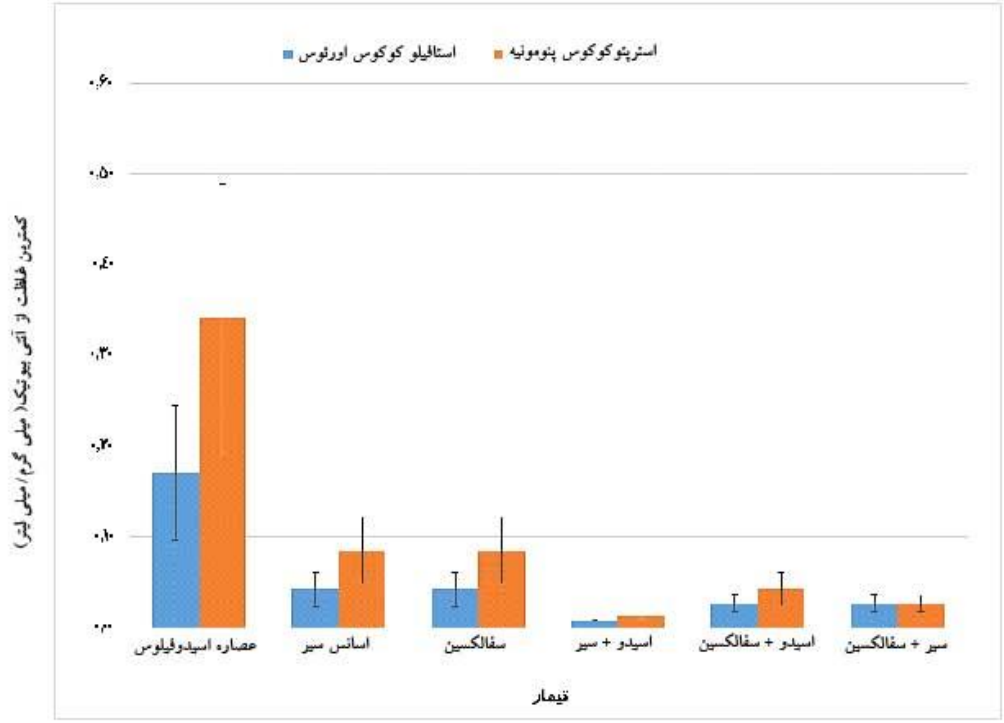
نمودار ۲- مقایسه میانگین±انحراف معیار قطر منطقه عدم رشد میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه، متأثر از ترکیبات مورد آزمایش (میلی‌متر)

-نتایج حاصله از مقایسه میانگین حداقل غلظت مهار از رشد (MIC) **پالیده *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، اسانس سیر، آنتی‌بیوتیک سفالکسین و حالت‌های ترکیبی آن‌ها بر باکتری‌های مورد مطالعه:** مطابق داده‌های ارائه شده در نمودار ۳، یافته‌ها حاکی از آن است که میانگین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* تحت تاثیر پالیده لاکتوباسیلوس *اسیدوفیلوس*، اسانس سیر، آنتی‌بیوتیک و همچنین ترکیب پالیده لاکتوباسیلوس *اسیدوفیلوس* + اسانس سیر، پالیده *اسیدوفیلوس* + سفالکسین به‌طور غیرمعنی‌داری کمتر از *استرپتوکوکوس پنومونیه* بوده است و حداقل غلظت بازدارندگی از رشد ترکیب اسانس سیر + سفالکسین بر روی هر دو باکتری یکسان بود (سطح معنی‌داری در خصوص پالیده= ۰/۱۴۸، اسانس سیر= ۰/۱۴۸، سفالکسین= ۰/۱۴۸، پالیده + اسانس سیر= ۰/۱۱۶، پالیده + سفالکسین= ۰/۲۵۱، سیر+سفالکسین= ۱).



نمودار ۳- مقایسه میانگین±انحراف معیار حداقل غلظت ممانعت از رشد میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه، متأثر از ترکیبات مورد آزمایش (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)

- نتایج حاصله از مقایسه میانگین حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) پالیده *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، اسانس سیر، آنتی‌بیوتیک سفالکسین و حالت‌های ترکیبی آن‌ها بر باکتری‌های مورد مطالعه: مطابق داده‌های ارائه شده در نمودار ۴ هم مشخص گردید که میانگین حداقل غلظت باکتری‌کشی پالیده *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، اسانس سیر، آنتی‌بیوتیک سفالکسین و همچنین ترکیب پالیده *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* + اسانس سیر، پالیده *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* + سفالکسین علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌طور غیرمعنی‌داری کمتر از مقدار مربوطه در خصوص *استرپتوکوکوس پنومونیه* و حداقل غلظت کشندگی ترکیب اسانس سیر + سفالکسین بر روی هر دو باکتری یکسان بوده‌است.



نمودار ۴- مقایسه میانگین ± انحراف معیار حداقل غلظت کشندگی میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه متأثر از ترکیبات بازدارنده (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که از ۱۰۲ نمونه عفونت گوش میانی مورد مطالعه در سگ‌های شهرستان ارومیّه، تعداد ۵۰ نمونه مربوط به جنس نر و ۵۲ نمونه مربوط به جنس ماده بودند. هم چنین نتایج کشت باکتریایی بر روی ۱۰۲ نمونه عفونت گوش میانی اخذ شده از سگ‌های شهرستان ارومیّه حاکی است که در مورد۹۰ نمونه (۸۸/۲۴ درصد نمونه‌های بررسی‌شده) علّت اوتیت سگ‌ها، باکتریایی بوده و در ۱۲ مورد هم (۱۱/۷۶ درصد نمونه‌های بررسی‌شده)، عوامل دیگری، باعث ایجاد عفونت در گوش میانی بوده‌است (جدول ۱ و نمودار ۱). در این خصوص، در مطالعهٔ مروری ورهوف و همکاران در سال ۲۰۰۶، گزارش شده که میکروارگانیسم‌های هوازی متداول جداشده از ترشحات عفونت مزمن گوش میانی در دوران کودکی شامل *سودوموناس آئروژینوزا* (۱۸ تا ۶۷ درصد)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (۱۴ تا ۳۳ درصد)، گونه‌های پروتئوس،گونه‌های *کلبسیلا* و گونه *اشریشیاکولای* (۴ تا ۴۳ درصد) و *هموفیلوس آنفلوانزا* (۱ تا ۱۱ درصد) می‌باشند (Verhoeff *et al.*, 2006) که مطابق نتایج ارائه شده در نمودار ۱، با یافته‌های مطالعه حاضر، همخوانی دارد. همچنین نمایی و همکاران در سال ۱۳۹۴

مطالعه‌ای در خصوص شیوع علل باکتریال ایجادکننده اوتیت میانی مزمن همراه با تجمع مایع و مقاومت دارویی آن‌ها در شهر بیرجند انجام دادند که از ۱۰۰ نمونه مورد بررسی، ۸۷ نمونه با نتیجه کشت مثبت و شایع‌ترین باکتری‌های جداشده عبارت بودند از استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی (۳۹ درصد) و استرپتوکوک‌های آلفا، بتا و غیرهمولیتیک (۲۴ درصد) (Namaei *et al*., 2015).

از طرف دیگر، نتایج تحقیق حاضر نشان داد ترکیب پالیده *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و اسانس سیر به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها باعث افزایش قطر منطقه مهار رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس پنومونیه* گردیده‌است (p<۰/۰۵) (نمودار ۲). همچنین میانگین قطر منطقه مهار رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* تحت تاثیر اسانس سیر، آنتی‌بیوتیک سفالکسین و همچنین پالیده *اسیدوفیلوس* + سفالکسین به‌طور غیرمعنی‌داری بیشتر از مقدار مربوط به *استرپتوکوکوس پنومونیه* بود، لیکن پالیده *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و همچنین پالیده *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* + اسانس سیر توانست به‌طور معنی‌داری از رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به *استرپتوکوکوس پنومونیه* ممانعت بیشتری نماید (p<۰/۰۵) (نمودار ۲).

در این ارتباط یوسف‌وند و همکاران در سال ۱۳۹۷ به بررسی مقایسه‌ای اثرات ضدّباکتریایی عصاره سیر و آنتی‌بیوتیک‌ها، بر روی ۳ گونه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، *استرپتوکوکوس پنومونیه* و *شیگلا دیسانتریه* پرداختند. نتایج حاصله نشان داده که MIC عصاره سیر با غلظت‌های مختلف برحسب mg/dl بر باکتری‌های فوق به ترتیب، در عصاره خالص ۲۵ mm، ۲۳، ۱۵ و غلظت $\frac{1}{2}$ mg/dl: ۲۲ mm ، ۲۰ ، ۱۲ و غلظت $\frac{1}{4}$ mg/dl: ۱۸، ۱۶، ۱۰ و غلظت $\frac{1}{8}$ mg/dl: ۱۵ mm ، ۱۳، ۰ و غلظت‌های $\frac{1}{16}$ و $\frac{1}{32}$ و $\frac{1}{64}$ برای هر ۳ باکتری صفر می‌باشد. براساس نتایج حاصله از مطالعه فوق، مشخص گردید که در شرایط آزمایشگاهی عصاره سیر بر هر ۳ باکتری مذکور اثر بازدارندگی داشته و نیز اثر مهاری عصاره سیر بر روی باکتری‌های مذکور، در شرایط آزمایشگاه، کمابیش به خوبی اثر مهاری آنتی‌بیوتیک‌های بررسی‌شده، می‌باشد (Yousefvand *et al*., 2018) و نتایج این پژوهش، با نتایج مطالعهٔ حاضر هم‌خوانی دارد. همچنین سرینی‌واسان و همکاران در سال ۲۰۰۹ طی مطالعه‌ای فعالیّت ضدّمیکروبی عصاره سیر و پایداری آن در دماهای مختلف را انجام داده و اثر ضدّمیکروبی عصاره آبی سیر بر روی ۱۷ گونه از باکتری‌های گرم مثبت و منفی که مقاومت چندداروییی هم داشتند را بررسی نموده و گزارش کردند که عصاره آبی سیر منطقه عدم رشد در اطراف ۱۵ گونه باکتری گرم مثبت و ۲ گونه باکتری گرم منفی ایجاد کرد، به‌طوری‌که بزرگ‌ترین منطقه عدم رشد در اطراف باکتری گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا* و کوچک‌ترین منطقه عدم رشد هم در اطراف گونه‌های مختلف باکتری گرم منفی پروتئوس ایجاد شد. همچنین در پژوهش مذکور، مقدار MIC عصاره آبی سیر برای باکتری‌های گرم منفی در محدوده ۷–۲۱ mg/ml و برای باکتری‌های گرم مثبت در محدوده ۶–۱۱ mg/ml به‌دست آمد (Srinivasan *et al*., 2009)، که ملاحظه می‌شود نتایج این تحقیق هم با نتایج مطالعهٔ حاضر هم‌خوانی دارد. از

طرف دیگر سامبانساموسی و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثرات ضدّمیکروبی و ضدّ بیوفیلمی مواد فعال سطحی چند گونه از لاکتوباسیلوس‌ها را بر باکتری‌های بیماری-زای مقاوم به آنتی‌بیوتیک را مورد مطالعه قرارداده و مشخص کردند که مواد فعال سطحی گونه‌های *لاکتوباسیلوس جانسنی* و *لاکتوباسیلوس رامنوس* باعث مهار رشد و همچنین ممانعت از تشکیل بیوفیلم باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کولای* و *اسینتوباکتر بومانی* و همچنین سبب آسیب به غشای سلولی باکتری *اسینتوباکتر بومانی* و دیواره سلولی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌شود (Sambanthamoorthy *et al*., 2014). نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه حاضر هم خوانی دارد.

یافته‌های حاصله از مطالعه حاضرنشان داد که پالیده *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و عصاره سیر می تواند باکتری‌های غالب ایجادکننده اوتیت درسگ‌های شهرستان ارومیّه (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس پنومونیه*) را تقریباً به اندازه آنتی بیوتیک‌های رایج، مهار نماید و لذا ترکیب پالیده *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و عصاره سیر می‌تواند با عوارض جانبی کمتر و بدون نگرانی از مقاوم شدن باکتری‌های مولد عفونت‌های میانی گوش در مقابل آن، به عنوان یک داروی طبیعی، جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های صناعی گردد.

تعارض منافع

نویسنده اعلام می‌دارد که هیچ‌گونه تضاد منافع وجود ندارند.

منابع

- Akimoto, Y., Uda, A., Omata, H., Shibutani, J., Nishimura, H., Komiya, M., *et al.* (1990). Cephalexin concentrations in human serum, gingiva, and mandibular bone following a single oral administration. General Pharmacology, 21(5): 621-623.
- Alberti, P.W., Bastos, I., Bluestone, C.D., Brobby, G. and Hendarmin, H. (2000). Prevention of hearing impairment from chronic otitis media. Report of a Who/Ciba Foundation Worksho, pp: 24-25.
- Allium sativum, L. Kew science (2017). Plants of the World Online; Royal Botanic Gardens, Kew, England.
- García Perdomo, C.M., Ramírez Minota, P.A., Zúñiga-Benítez, H. and Peñuela G.A. (2022). Cephalexin removal by persulfate activation using simulated sunlight and ferrous ions. Water Science Technology, 85(1): 52-62.
- Ghadimipour, R., Sedigh-Eteghad, S., Chalangar, R., Alipoor-yeganeh, M., Khadiri, B. and Afkari Gh. (2015). In Vitro antibacterial properties of aqueous extract of garlic against on common diarrhea causing bacteria. Journal of North Khorasan University of Medical Sciences, 7(2): 357-366. [In Persian]
- Kefili, T., Razavi, S.H., Emam-Jome, Z., Salehi, G.R. and Neghavi, M.R. (2010). A Comparison of Two Molecular Microbiological Methods, RAPD-PCR and DGGE-PCR for Identification of Lactobacilli

Strains Isolated During Lighvan Cheese Making Process. Iranian Journal of Biosystems Engineering, 40: 35-45. [In Persian]

- Khiralla, G.M., Mohamad, E.A.H., Farag, A.G. and Elhariry, H. (2015). Ntibiofilm effect of Lactobacillus pentosus and Lactobacillus plantarum cell-free supernatants against some bacterial pathogens. Journal of Biotechnology Research, 6: 86-95.
- Kullen, M.J., Sanozky-Dawes, R.B., Crowell, D.C. and Klaenhammer, T.R. (2002). Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the Lactobacillus acidophilus complex. Journal of Applied Microbiology, 89(2): 511-516.
- Lieberthal, A.S., Carroll, A.E., Chonmaitree, T. Ganiats, T.G., Hoberman, A., Jackson, M.A., et al. (2013). The diagnosis and management of acute otitis media. Pediatrics, 131(3): 964-999.
- Namaei, M.H., Mehramiz, M., Ghannadkafi, M. and Mofatteh, M.R. (2015). Prevalence of bacterial causes of chronic otitis media with effusion and their drug resistance in Birjand. Journal of Birjand University of Medical Sciences, 22(1): 59-66. [In Persian]
- Minovi, A. and Dazert, S. (2014). Diseases of the middle ear in childhood". GMS current topics in otorhinolaryngology. head and neck surgery, 13: Doc11. doi: 10.3205/cto000114. PMC 4273172 Freely accessible. PMID 25587371.
- Qureishi, A., Lee, Y., Belfield, K., Birchall, J.P. and Daniel, M. (2014). Update on otitis media - prevention and treatment. Infection and Drug Resistance, 10: 15-24.
- Sambanthamoorthy, K., Feng, X., Patel, R., Patel, S. and Paranavitana, C. (2014). Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from Lactobacilli against multi –drug –resistant patogens. BMC Microbiology, 14: 1-9.
- Saki, N., Nikakhalagh, S., Sarafraz M., Rahim, F. and Zarpeyma, S. (2010). Epidemiological study of otitis media in children aged less than 6 years referring to health centers of Hovaiezeh city, Scientific Medical Journal (AJUMS), 9(1): 53-62. [In Persian]
- Srinivasan, K. (2009). Dietary fenugreek seed regressespreestalished cholesterol gallstones in mice. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 87(9): 684-693.
- Verhoeff, M., Vanderveen, E.L., Rovers, M.M., Sanders, E.A.M. and Schilder A.G.M. (2006). Chronic suppurative otitis media. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology, 70(1): 1-2.
- Yousefvand, E., Safinejad, K. and Mohammad Asghari H. (2018). Comparing Antibacterial effects of Garlic with Antibiotics by Staphylococcus Aureus Resistant to Methicillin, Streptococcus Pneumoniae and Shigella Dysenteriae Bacteria. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal, 8(30): 53-60. [In Persian]