تاثیر ترکیب تجاری عصاره‌های آویشن‌باغی و ختمی و اثر هم‌افزایی با آنتی‌بیوتیک اریترومایسین بر جمعیت میکروبی بافت کبد و طحال جوجه‌های گوشتی درگیر با سالمونلا تیفی‌موریوم

داودی،ز[۱]، استاجی،ح[*۲]، عمادی‌چاشمی،ح[۳]، غفاری‌خلیق،س[۴]

دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۰۸ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۱۷

خلاصه

سالمونلاتیفی‌موریوم یکی از بیماریزاترین سالمونلاها بوده که منجر به آلودگی در انسان، دام و طیور می‌شوند. استفاده بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها در جهت کاهش عوارض و از بین بردن باکتری‌ها در دوزهای مختلف، منجر به ایجاد مقاومت می‌شود. بنابراین استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی بدون عوارض جانبی، امری مهم تلقی می‌شود.

پژوهش حاضر به منظور بررسی اثر ضدمیکروبی ترکیب دو عصاره آویشن‌باغی و ختمی و هم‌افزایی این ماده با اریترومایسین بر عفونت سالمونلاتیفی‌موریوم، انجام گرفت.

بدین منظور، از ۴۰ قطعه جوجه یک روزه نژاد رأس ۳۰۸ در چهار گروه، استفاده گردید. تیمارهای آزمایشی شامل کنترل منفی، درمان با آنتی‌بیوتیک، درمان با تیماسین‌پلاس و درمان با آنتی‌بیوتیک و تیماسین‌پلاس بود. پس از القای عفونت، در روزهای چهار و دوازده، بعد از مرگ با ترحم، بافت کبد و طحال جداسازی و مورد آزمایش، قرار گرفت.

نتایج حاصل از شمارش کلنی اثبات کرد، شربت تیماسین‌پلاس دارای اثر ضدمیکروبی بر روی باکتری سالمونلاتیفی‌موریوم است. بیشترین میزان باکتری مختص گروه کنترل و کمترین مقدار مربوط به گروه درمان با آنتی‌بیوتیک و تیماسین‌پلاس، بود؛ همچنین مشخص شد شربت تجاری تیماسین‌پلاس عملکردی مشابه با آنتی‌بیوتیک دارد و به‌صورت هم‌افزایی با آنتی‌بیوتیک در کاهش جمعیت باکتری موثر می‌باشد.

بهتر است در زمان بروز عفونت ناشی از سالمونلا تیفی‌موریوم، به جای استفاده از مواد شیمیایی، از داروی گیاهی تیماسین‌پلاس استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: سالمونلا تیفی‌موریوم، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، شربت تیماسین‌پلاس®، آویشن‌باغی، ختمی.

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.
۲- دانشیارگروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.
۳- استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.
۴- استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
* نویسنده مسئول: hstaji@semnan.ac.ir

مقدمه

سالمونلا تیفی‌موریوم باسیل گرم منفی درون سلولی اختیاری، فاقد اسپور در اندازه بین ۲ تا ۵ میکرومتر و قطر ۰/۷ تا ۲/۵ میکرومتر متحرک بوده و دارای فلاژل‌های پری‌تریش می‌باشد همچنین به صورت منفرد، زنجیره‌ی دوتایی و یا چندتایی یافت می‌شود و بیماری‌زایی در انسان و حیوانات را به همراه دارد (Javan J و همکاران, ۲۰۱۲ ;Marchello CS و همکاران, ۲۰۲۲). اعضای این جنس، بطور معمول از راه دهان وارد دستگاه گوارش انسان‌ها، پستانداران و پرندگان شده و سبب بروز عفونت‌هایی از جمله، گاستروانتریت، تب روده، باکتریمی و یک حالت ناقل مزمن می‌شود. استفراغ، اسهال، دل‌درد و تب از علائم عمومی این سویه می‌باشد که نهایتا ۳ تا ۵ بعد از ورود به بدن، ظاهر می‌شود (Álvarez-Ordóñez A و همکاران, ۲۰۱۱؛ Galan JE , ۲۰۲۱). عفونت سالمونلایی، ممکن است در سراسر جهان اتفاق بیوفتد اما طی بررسی‌های انجام گرفته امکان شیوع در مکان‌های پرورش حیوانات بسیار بیشتر از سایر مناطق است (Funk J ، ۲۰۱۴). پس از ورود باکتری به سلول میزبان، ابتدا پروتئین‌های اختصاصی باکتری با ایجاد فاز اولیه عفونت، پروتئین‌های A(Sip) و E2/E(Sop) نقش بسزایی در حدت بیماری دارند. همکاری همزمان این سه پروتئین می‌تواند سبب حمله موثر سالمونلا به سلول‌های اپی‌تلیال و درنهایت اسهال و علائم بسیار شدید بیماری شود. با سیستم فاگوسیت کننده مونونوکلئار، پاسخ ماکروفاژی (در گروه‌ها مقاوم‌تر) و مهندسی ژنتیکی یا هرگونه عملی که منجر به محدودکردن تکثیر سالمونلا شود، می‌توان در برابر این باکتری مقاومت کرد (Balasubramanian D و همکاران ۲۰۲۲). با شیوع و همه‌گیری سالمونلا، در جهت کاهش عوارض و از بین بردن باکتری‌ها از طیف گسترده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها در دزهای مختلف استفاده شد. با مصرف بی رویه آنتی‌بیوتیک‌ها، به مرور زمان، تغییراتی در ساختار ژنتیکی باکتری به وجود می‌آید که باعث مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک می‌شود این اتفاق، قابل انتقال به نسل‌های بعد می‌باشد. باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، می‌توانند به طور گسترده در محیط‌هایی مانند فاضلاب، رودخانه‌ها، دریاچه‌ها و حتی آب آشامیدنی، پخش شوند به گسترش بیشتر سروار کمک کنند (Eng SK و همکاران, ۲۰۱۵) . طبق تحقیقاتی که بر روی سویه‌های مختلف سالمونلا در چین انجام گرفت، متوجه وجود مقاومت نسبت به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها شدند به این صورت که در سالمونلا تیفی میزان مقاومت به تتراسایکلین (۹۳٪)، آمپی‌سیلین (۹۱٪)، سولفیسوکسازول (۸۶٪)، استرپتومایسین (۷۶٪)، نالیدیکسیک اسید (۷۳٪)، کلاوولانیک اسید (۷۰٪) و کلرامفنیکل (۵۴٪) می‌باشد (Qin X و همکاران, ۲۰۲۲). مقدار دز عفونی در گونه‌های سالمونلا یکسان نیست. 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.

آویشن باغی (Thymus Vulgari) یکی از شناخته شده‌ترین جنس آویشن و بومی جنوب اروپا از غرب مدیترانه تا جنوب ایتالیا است که از قرن شانزدهم به عنوان یک گیاه دارویی معرفی شد (Parsaei P و همکاران , ۲۰۱۶). آویشن درخچه‌ای کوتاه با شاخه‌ها متعدد و برگ‌های نازک که قسمت‌های دارویی این گیاه شامل سرشاخه‌ها و برگ‌ها خشک آن می‌باشد. ترکیبات ضدمیکروبی موثر در عصاره آویشن باغی حاوی فلاوونوئیدهایی مانند اپی‌ژنین و لوتئولین و روغن‌های فرار حاوی کارواکرول و تیمول می‌باشد. از آویشن باغی برای درمان برونشیت، احتقان تنفسی بالا، گاستریت، اسهال، سیاه سرفه، مشکلات قلبی و عصبی استفاده می‌شد (Akermi S و همکاران, ۲۰۲۲).

ختمی (Altheae Spp) از تیره پنیرک و یکی از گیاهان دارویی و مهم در جهان بشمار می‌رود. این گیاه در خراسان، اطراف اراک، دامنه‌های البرز و آذربایجان، می‌روید. از ختمی برای درمان سرفه و به عنوان نرم‌کننده مجاری تنفسی و خلط آور استفاده می‌شود همچنین این گیاه دارای اثرات ضدعفونی‌کنندگی می‌باشد و برای درمان زخم‌های پوستی کاربرد دارد (Eshraghi SS, Amin GH, ۲۰۰۹). از برگ ختمی بصورت ضماد برای انواع ورم و شکستگی استفاده می‌گردد.

مواد و روش کار

کشت باکتری

استوک باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* سویه ATCC۱۴۰۲۸ تهیه گردید، سپس میزان ۱ لوپ از باکتری برداشته و به محیط BHI براث (مرک، آلمان) برده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوبه کردن، ۱۰۰ ماکرولیتر از باکتری برداشته و مجددا به محیط BHI انتقال داده شد. با گذشت ۲۴ ساعت، توسط دستگاه اسپکتوفوتومتری با روش رقت سازی، غلظت باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* به 10^6 (نیم مک فارلند) کاهش داده شد.

نمونه‌های مورد آزمایش

برای بررسی اثر ضدمیکروبی و هم‌افزایی ترکیب دو عصاره موجود در شربت تیماسین‌پلاس، از ۴۰ عدد جوجه یکروزه راس ۳۰۸ مخلوط هر دو جنس با میانگین وزن ۱۰۰ گرم استفاده شد (کد اخلاق IR.SU.REC.1402.6). قبل از تهیه جوجه‌ها، محل نگهداری و ظروف مورد نظر با دزوجرم ضدعفونی گردید. در طول انجام آزمایش کلیه شرایط بهینه رشد از جمله، دمای ۳۲±۲، رطوبت ۵±۶۰٪، دسترسی آزاد به آب و جیره غذایی (پیش آغازین و آغازین طبق دستور شرکت تولیدکننده) فراهم بود (Bustamante E و همکاران, ۲۰۱۲).

القای باکتری

ابتدا طی مرحله پایلوت‌گذاری، در ۵ جوجه با غلظت‌های متفاوتی از باکتری، القای عفونت صورت گرفت. چهار روز پس از تلقیح *سالمونلا تیفی‌موریوم*، جوجه‌ها مورد مرگ با ترحم قرار گرفتند. پس از ضدعفونی کردن سطح ارگان‌های مورد نظر با یک کاردک داغ، نمونه‌های ارگان‌ها در محیط ss آگار (مرک، آلمان) و بلاد آگار (مرک، آلمان)، کشت داده شد و با گذشت ۲۴ ساعت از کشت چمنی، کلنی‌های مختص *سالمونلا* در محیط SS آگار (کلنی‌های زرد رنگ با محوریت سیاه) و بلاد آگار مشاهده شد. با انجام تست‌های افتراقی از وجود باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* در نمونه‌های کشت داده شده در محیط بلاد آگار (TSI: $Alk/A.H_2S^+$ Citrate ✻ + ✻ :LIA ✻ + :MR ✻ + :VP ✻ − :Urea ✻ − :SIM ✻ − M − I :ONPG ✻ + −)، اطمینان حاصل شد. سرانجام ۲میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری *سالمونلا* از طریق گاواژ چینه‌دان با سوند معدی به صورت خوراکی به گروه‌های مورد مطالعه منتقل گردید و عفونت به صورت تجربی در آنها القای شد (Lopes PD و همکاران, ۲۰۱۶).

یافتن دوز مناسب داروی مصرفی

ابتدا با تست بررسی حداقل غلظت مهاری (MIC) میزان دوز مناسب و دقیق داروی مصرفی را تحت شرایط آزمایشگاهی یافت شد و سپس نتایج حاصل از این تست را به گروه‌های درمانی تعمیم گردید. با این تست می‌توان، کم‌ترین دوز از داروی تیماسین‌پلاس را که توان محدود کردن رشد *سالمونلا تیفی‌موریوم* در یک انکوباسیون ۲۴ ساعته دارد را یافت. در این روش ابتدا غلظت‌های مختلف شربت تیماسین‌پلاس در لوله های مختلف ریخته شد پس از آن مقدار معینی (۱میلی‌لیتر) باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* به هر لوله اضافه شد؛ همچنین دو لوله به عنوان کنترل مثبت (محیط کشت به همراه باکتری) و منفی (فقط محیط کشت) در نظر گرفته شد. غلظت شربت موجود در آخرین لوله بدون کدورت، به عنوان MIC انتخاب گردید. سپس برای تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) از لوله MIC و بعد از آن، مقدار کمی سوسپانسیون با سوآپ به پلیت حاوی محیط کشت آگاردار منتقل شد. پلیتی که هیچ کلنی قادر به رشد نبود، به عنوان MBC گزارش می‌شود (Owuama CI, 2017).

درمان

۲۴ ساعت بعد از القای عفونت *سالمونلا تیفی‌موریوم*، به طور تصادفی جوجه‌ها به ۴ گروه تقسیم شدند، تیمارهای آزمایشی شامل چهار گروه، کنترل منفی (در کل مدت پژوهش هیچ گونه مداخله دارویی صورت نمی‌گیرد)، درمان با آنتی‌بیوتیک اریترومایسین با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن جوجه، درمان با شربت تیماسین‌پلاس® با دوز ۵۰ میکرولیتر و درمان با ترکیب آنتی‌بیوتیک اریترومایسین با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن جوجه و شربت تیماسین‌پلاس® با دوز ۵۰ میکرولیتر، بود. این روند درمانی تا یک روز قبل از نمونه‌گیری ادامه داشت.

نمونه‌گیری

طی این پژوهش دو نمونه‌گیری، یکی در روز ۴ و دیگری در روز ۱۲ انجام گرفت. پس از مرگ با ترحم، بافت کبد و طحال جدا و به ظرف‌های نمونه‌گیری انتقال داده شد.

بررسی کالبدگشایی بافت‌ها

در حین نمونه‌گیری و کالبدگشایی، در برخی گروه‌ها پدیده‌هایی نظیر، التهاب و عدم جذب کیسه زرده، مدفوع گچی، تورم و پرخونی کبد و طحال، مشاهده شد که وجود این علائم دال بر حضور باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* در گروه‌های درمانی می‌باشد (Gutierrez A, ۲۰۲۲).

بررسی میکروسکوپی و شمارش کلنی

برای شمارش کلنی، ابتدا ۱ گرم از بافت کبد و طحال، هر گروه برداشته و درون هاون ریخته می‌شود. مقدار ۱ سی‌سی از محلول پپتون‌واتر به آن اضافه و ترکیب فوق کاملا مخلوط می‌گردد. ترکیب عصاره بافت و پپتون‌واتر را به درون یک لوله آزمایش با ۹ سی‌سی پپتون‌واتر مخلوط کرده و بدین شکل رقت 10^{-1} را ایجاد می‌شود. به منظور تشکیل رقت 10^{-2}، در یک لوله مجزا، از لوله اول ۱ سی‌سی برداشته و با ۹ سی‌سی پپتون‌واتر مجددا ترکیب می‌گردد. رقت 10^{-3} نیز به همین صورت ساخته می‌شود.

به منظور کشت باکتری از رقت‌های 10^{-1}، 10^{-2} و 10^{-3}، ابتدا از هر رقت ۱۰۰ لاندا جدا کرده و به پلیت‌های حاوی محیط کشت اختصاصی ss آگار و بلاد آگار، اضافه شد و به وسیله اسپریدر استریل شده، کشت سطحی انجام

گرفت. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، درون انکوباتور قرار و بعد از ۲۴ ساعت شمارش باکتری‌ها صورت گرفت (Farikoski IO و همکاران , ۲۰۱۹).

طرح آماری و آنالیز داده‌ها

داده‌ها پس از جمع‌آوری، با نرم افزار SPSS مورد بررسی و تحلیل قرار گرفتند و با استفاده از روش Oneway Anova، مورد آنالیز آماری قرار گرفت و داده‌ها در قالب گراف بیان شدند.

نتایج

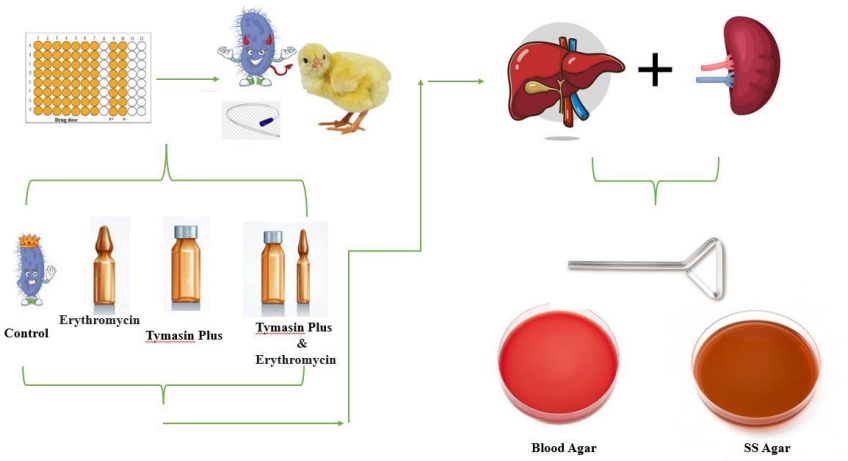
نتایج تست MIC و MBC

با توجه به نتایج این تست‌ها، حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی شربت تیماسین‌پلاس بر روی مقدار مشخص (۱ میلی‌لیتر) *سالمونلا تیفی‌موریوم* ۲۵ میکرولیتر و حداقل غلظت نابودکنندگی ۶۰ میکرولیتر بدست آمد.

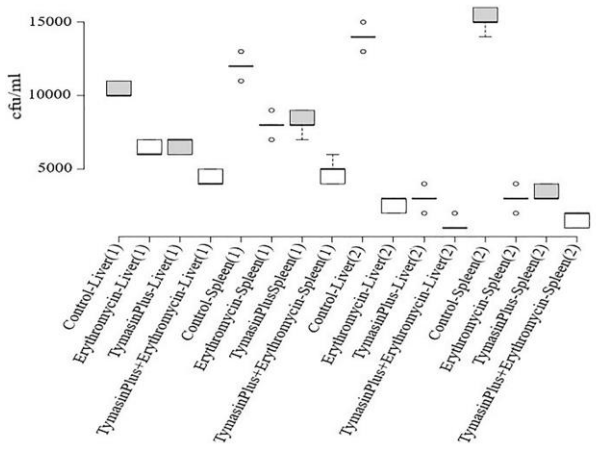
نتایج شمارش کلنی در محیط بلاد آگار و ss آگار

تصویر ۱ نتایج حاصل از شمارش باکتری‌های موجود در طحال و کبد در محیط بلاد آگار به روش شمارش کلنی می‌باشد. طبق این نتایج بیشترین مقدار باکتری مربوط به گروه کنترل در نمونه‌گیری اول و دوم می‌باشد و این گروه با سایر گروه‌ها دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد. گروه درمان با ترکیب شربت تیماسین‌پلاس و آنتی‌بیوتیک اریترومایسین، بهترین و موفق‌ترین گروه در بین گروه‌های مورد مطالعه می‌باشد. در نمونه‌گیری اول، گروه درمان با آنتی‌بیوتیک اریترومایسین و درمان با شربت تیماسین‌پلاس، دارای نتایج یکسانی بوده ولی در نمونه‌گیری دوم گروه درمان با اریترومایسین به اندازه بسیار کمی نسبت به درمان با شربت تیماسین‌پلاس موفق‌تر عمل کرده است.

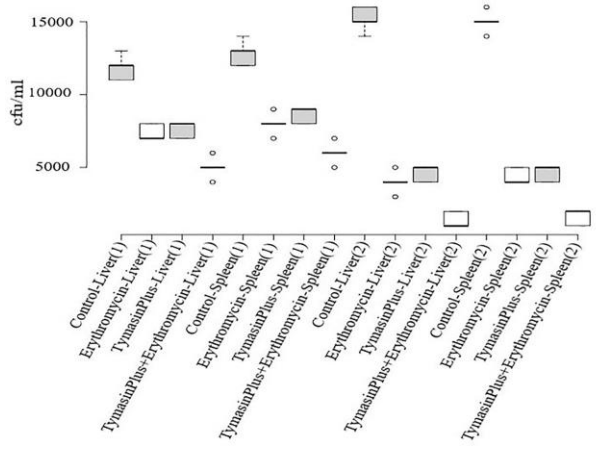
تصویر ۲ نتایج حاصل از شمارش باکتری‌های موجود در طحال و کبد در محیط SS آگار، به روش شمارش کلنی می‌باشد. برحسب این نتایج، بیشترین مقدار باکتری به گروه کنترل در نمونه‌گیری اول و دوم اختصاص می‌یابد و این گروه با سایر گروه‌ها دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد. یافته‌های حاصل از دو گروه درمان با آنتی‌بیوتیک اریترومایسین و درمان با شربت تیماسین‌پلاس به این صورت می‌باشد که در نمونه‌گیری اول در کبد و نمونه‌گیری دوم در طحال نتایج یکسان ولی در نمونه‌گیری اول طحال و نمونه‌گیری دوم کبد، قدرت ضدمیکروبی اریترومایسین به اندازه خیلی کمی از گروه درمان با شربت تیماسین‌پلاس، بیشتر بوده است و بیشترین خاصیت ضدمیکروبی در بین تمامی گروه‌های مورد مطالعه به گروه درمان با ترکیب شربت تیماسین‌پلاس و آنتی‌بیوتیک اریترومایسین اختصاص دارد.



چکیده تصاویر



تصویر۱. تصویر نمودار تعداد کلنی‌های رشد یافته در محیط بلاد آگار برحسب CFU/ml. محور عمودی تعداد کلنی و محور افقی نام گروه‌ها



تصویر۲. تصویر نمودار تعداد کلنی‌های رشد یافته در محیط ss آگار برحسب CFU/ml. محور عمودی تعداد کلنی و محور افقی نام گروه‌ها

بحث

در این پژوهش سعی شد از شربت گیاهی تیماسین‌پلاس برای درمان عفونت تجربی سالمونلا تیفی‌موریوم موجود در جوجه‌های گوشتی راس ۳۰۸ استفاده شود. ۲۴ ساعت پس از القای عفونت با دوز مشخص باکتری، نمونه‌ها گروه‌بندی شده و درمان با شربت تیماسین‌پلاس، آنتی‌بیوتیک اریترومایسین و ترکیب شربت تیماسین‌پلاس و اریترومایسین، آغاز شد. در روزهای چهارم و دوازدهم پس از القای عفونت، نمونه‌گیری صورت گرفت و از بافت کبد و طحال، استفاده گردید.

طی بررسی‌هایی که بین سال‌های ۲۰۲۱-۲۰۱۱ حول بررسی میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی رخ داد، مشخص شد، در بین ۴۵۱۴ ایزوله جداسازی شده از حیوانات، انسان‌ها، غذاها و محیط‌زیست، بیشترین مقادیر مقاومت (≤ ۷۵٪) مربوط به آمپی‌سیلین، تتراسایکلین، استرپتومایسین و سولفیسوکسازول؛ (۵۰-۷۵٪) برای اسید کلاوولانیک، آموکسی‌سیلین، نالیدیکسیک‌اسید و کلرامفنیکل؛ (۲۵-۵۰٪) برای جنتامایسین تری‌متوپریم، کانامایسین و سولفامتوکسازول و (≥ ۲۵٪) یا کمترین میزان مقاومت به اریترومایسین، سیپروفلوکساسین، سفپیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، کولیستین و سفتازیدیم بوده است (Farikoski IO و همکاران, ۲۰۱۹; Oladeinde A و همکاران, ۲۰۱۹; Shen W و همکاران, ۲۰۲۲; Staji H و همکاران, ۲۰۱۷) Aelenei P و همکاران در ۲۰۱۹ به مقایسه اثر دو آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و اریترومایسین بر روی باکتری‌های گرم منفی و مثبت پرداختند و دریافتند آنتی‌بیوتیک اریترومایسین دارای عملکرد مهاری بالاتری بر روی اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا نسبت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین است (Aelenei P و همکاران, ۲۰۱۹) Sánchez-Salazar و همکاران در سال ۲۰۲۰، به بررسی میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های سالمونلا در

مزارع مرغداری اکوادور پرداختند؛ در این پژوهش از تکنیک انتشار دیسک برای ارزیابی حساسیت ضدمیکروبی سروارهای سالمونلا انتریکا، استفاده گردید. در این بررسی ثابت شد، سفالوسپورین‌ها، نیتروفوران‌ها، آمینوگلیکوزیدها، فنیکل، سولفامتوکسازول و تتراسایکلین دارای مقاومت صددرصدی و ماکرولیدها، فلوروکینولون‌ها و فسفومایسین دارای کمترین میزان مقاومت می‌باشند (Sánchez-Salazar E و همکاران, ۲۰۲۰). حدود دهه ۱۹۵۰، اولین استفاده بالینی از آنتی‌بیوتیک اریترومایسین به ثبت رسید؛ مکانیسم‌های عملکردی آنتی‌بیوتیک‌های خانواده ماکرولیدها به صورت مهار تولید پروتئین‌های عملکردی باکتری‌ها، سرکوب التهاب و کاهش عوارض باکتریایی می‌باشد (Amsden GW ,۲۰۰۵) با در نظر گرفتن نتایج بررسی‌های فوق، آنتی‌بیوتیک اریترومایسین به عنوان آنتی‌بیوتیک کاندید در این پژوهش انتخاب شد.

عفونت‌زایی در طیور ممکن است یک مسیر بالقوه برای ورود باکتری‌های بیماری‌زا به زنجیره غذایی و افزایش تعداد میزبان باشد. بنابراین بکارگیری روش‌ها و اقداماتی در جهت کاهش عفونت بدون ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میزبان، امری حیاتی تلقی می‌شود. با توجه به بروز مقاومت سالمونلا تیفی‌موریوم نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، به نظر می‌رسد استفاده از چندین ترکیب دارویی طبیعی مختلف باهم و ترکیب آنتی‌بیوتیک با داروی گیاهی یکی از راه‌های غلبه بر مقاومت باکتری‌ها می‌باشد. به این منظور چندین سال است، استفاده از داروهای گیاهی مورد توجه همگان قرار گرفته است و می‌توان از آن‌ها به صورت جایگزین و یا هم‌افزایی آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های باکتریایی استفاده کرد. طی سال‌های گذشته، پژوهش‌های مختلفی در این زمینه صورت گرفت و تاثیر ضدمیکروبی گیاهان مختلف برروی باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم بررسی و مورد تایید واقع شد؛ بطور مثال جهانتیغ و همکاران در سال ۱۴۰۰، با تست MIC و MBC تاثیر ضدمیکروبی عصاره دو گیاه کهورک و تاتوره بر سالمونلا تیفی‌موریوم را بررسی کردند و به تاثیر ضدمیکروبی این دو عصاره بر سالمونلا تیفی‌موریوم پی‌بردند؛ همچنین میزان مقاومت این سویه را با دیسک آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، آزیترومایسین، آموکسی‌سیلین و سفازولین در محیط مولر هینتون مقایسه کردند و مشخص شد، سالمونلا تیفی‌موریوم دارای بیشترین میزان مقاومت نسبت به آموکسی‌سیلین و جنتامایسین و کمترین میزان به ترتیب نسبت به اریترومایسین و سفازولین بوده است. (جهانتیغ و همکاران, ۲۰۲۰) بایگان و همکاران در سال ۱۴۰۱، با MIC و MBC به روش رقت لوله‌ای، اثر کاکوتی بر سالمونلا تیفی‌موریوم، ثابت کردند و دریافتند گیاه کاکوتی دارای اثر مهاری و ضد باکتریایی سالمونلا تیفی‌موریوم بوده و همچنین می‌تواند از این گیاه به عنوان نگه دارنده طبیعی در مواد غذایی، استفاده کرد. (بایگان و همکاران, ۲۰۲۰) آویشن‌باغی و ختمی دو ماده موثر موجود در شربت کاکوتی می‌باشند که به تنهایی خواص بسیار را دارا می‌باشند. اسانس آویشن در حال حاضر در سطح جهانی به عنوان یک نگهدارنده طبیعی، با اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی و ضدقارچی شناخته شده است. مختاری و همکاران در سال ۲۰۲۳، ثابت کردند که عصاره آویشن با مهار رادیکال‌های آزاد، کلاته‌کنندگی آهن پلاسما و هگزان، حائز اهمیت است؛ این ترکیبات با مکانیسم مهار آنزیم‌های باکتریایی منجر به مهار پمپ‌های مولد مقاومت آنتی‌بیوتیکی و اختلال در تعادل ATP و سنتز اجزای شبه ساختاری، ماده ژنتیکی را به همراه دارند. به طور کلی عصاره‌های حاوی ترکیبات فنلی مانند اوژنول، تیمول و کارواکرول، اثر ضدمیکروبی قوی بر میکروارگانیسم‌های پاتوژن دارند (Mokhtari R و همکاران, ۲۰۲۳) Vassiliou و همکاران در سال ۲۰۲۳، عنوان کردند که خاصیت ضدمیکروبی و ضدالتهابی آویشن به حضور تیمول، کارواکرول و لینالول بستگی دارد (Vassiliou و همکاران, ۲۰۲۳) Kachur K و همکاران در سال ۲۰۲۰، به بررسی مکانیسم‌های اثر کارواکرول و تیمول پرداختند و دریافتند، دو ماده موثر آویشن‌باغی، ترکیبات آبگریز هستند و به محض ادغام در غشای سلول باکتری، اختلال در عملکرد طبیعی غشاء را به همراه دارند همچنین این دو ماده با تجمع در اسید چرب زنجیره‌های غشاء، تغییرات ساختار دو لایه لیپیدی منجر می‌شوند (Kachur K,۲۰۲۰). Puvaca و همکاران در سال ۲۰۲۲، ثابت کردند که اجزای فعال موجود در آویشن‌باغی تقویت و افزایش میکروفلورهای روده را باعث می‌شوند که این ویژگی به عنوان یک سد دفاعی در برابر باکتری‌های بیماری‌زا عمل می‌کند ضمنا این ترکیبات با تثبیت pH محیط داخلی روده، بهبود فعالیت آنزیم‌های پانکراس را به همراه دارد که این عملکرد باعث هضم بهتر و جذب بیشتر مواد مغذی می‌شود (Puvača و همکاران, ۲۰۲۲)

گیاه ختمی حاوی پکتین ۱۱درصد، اسید فنولیک، موسیلاژ، فلاونوئیدها، اسکوپولتین، فیتواسترول‌ها و کومارین‌ها می‌باشد و در کاهش عفونت بسیار مفید می‌باشد. این عصاره، به دلیل خواص ضدالتهابی و ضدمیکروبی به عنوان یک داروی گیاهی سنتی برای التیام زخم شناخته شده است. وجود برخی پلی‌ساکاریدها از نوع رامنوگالاکتورونان منجر به تشکیل بافت‌های موسین مانند

در بالای بافت‌های تحریک شده می‌شود (Ayrle H و همکاران, ۲۰۱۶). به طور کلی از عصاره ختمی برای درمان عفونت‌های دستگاه گوارش و مجاری ادراری و هم‌چنین برای زخم، التهاب، آبسه، هموروئید، یبوست، معده درد، اسهال، التهاب کبد و طحال و بیماری‌های انسدادی استفاده می‌شود. فلاونوئیدهای موجود در ختمی، تأثیر بسیار قوی‌تری در سرکوب فاز حاد التهاب، دارنن و تحت تاثیر خاصیت ضد التهابی عصاره این گیاه، فرسایش معده در فاز حاد التهاب مشاهده نمی‌شود و درد در بیماران مصرف کننده ختمی نسبت به سایرین بسیار کمتر است (Pausan MR, ۲۰۲۲). Arab و همکاران در سال ۲۰۲۳، اثر ضدمیکروبی عصاره اتانولی و اتیل‌استات، اجزای مختلف گیاه ختمی، بر روی باکتری‌های گرم مثبت (باسیلوس سرئوس) و منفی (کلبسیلا پنومونیه) تایید کردند و با مقایسه هاله‌های عدم رشد عصاره‌های تهیه شده با هاله‌های عدم رشد آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین، جنتامایسین، پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین دریافتند که اتیل‌استات برگ و ساقه و عصاره اتانولی ساقه بیشترین اثر مهارکنندگی بر روی کلبسیلا پنومونیه دارا می‌باشند (Arab M و همکاران, ۲۰۲۱). Al-Awsi و همکاران در سال ۲۰۲۱، اثر ضدمیکروبی عصاره ختمی بر روی پاتوژن‌ها بیمارستانی شامل سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوژنز و اشریشیاکلی با دو روش آزمایشگاهی (MIC/MBC) و مدل حیوانی موش (Lateef Al-Awsi و همکاران, ۲۰۲۱)، و همچنین Khamees AH و همکاران در سال ۲۰۱۸، با بررسی و مقایسه قطر هاله عدم رشد عصاره‌های متانولی و آبی ختمی با آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و جنتامایسین، اثر ضدمیکروبی این گیاه بر پاتوژن‌های کلیدی گوارشی نظیر اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، کلبسیلا پنومونیه، سالمونلا انتریکا، پروتئوس ولگاریس و شیگلا (Khamees AH و همکاران, ۲۰۱۸)، ثابت کردند. Valiei و همکاران در سال ۲۰۱۱، اثر ضدمیکروبی موجود در عصاره هگزانی گل و ریشه گیاه ختمی بر سویه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، باسیلوس سوبتیلیس، انتروکوکوس فکالیس، استافیلوکوکوس اورئوس، کلبسیلا پنومونیه، اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا اثبات کردند (Valiei M, Shafaghat A, ۲۰۱۱).

شربت گیاهی تیماسین‌پلاس® به طور معمول برای درمان گلودرد، برونشیت و تسکین سرفه استفاده می‌شود اما با توجه به خواص آویشن‌باغی و ختمی که دو ماده موثر این دارو می‌باشد و تاثیر ضدمیکروبی هر یک از این عناصر به تنهایی، بررسی تاثیر ضدمیکروبی این شربت 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 فلفل سیاه، کلپوره و چای سبز نسبت به حالت منفرد هر یک از این عصاره‌ها، بر پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، بسیار زیاد و قابل مقایسه نیست (Masoumipour F و همکاران, ۲۰۱۹) همچنین D Amenu در سال ۲۰۱۴، ثابت کرد ترکیب عصاره گیاهان جینسنگ هندی، خرزهره، انجیر سیکامور و درمنه دشتی نسبت به حالت تکی این عناصر، در برابر سویه‌های اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوز و استافیلوکوکوس اورئوس، اثر ضدمیکروبی بیشتری دارند (Moussii IM, ۲۰۱۶,Amenu D). Moussii IM و همکاران در سال ۲۰۲۰ پی بردند که ترکیب سه عصاره اسطوخودوس، درمنه دشتی و رزماری اثر ضدمیکروبی زیادی بر روی سه سویه سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی دارند (Moussii IM و همکاران, ۲۰۲۰). طبق مطالعات انجام 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 و همکاران, ۲۰۲۳).

چندین سال است که استفاده همزمان اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی با آنتی‌بیوتیک‌های موجود به‌عنوان یک استراتژی جایگزین برای مدیریت عفونت‌های ناشی از مقاوم به دارو به صورت تجربی، مورد بررسی قرار گرفته است. کاهش دوز 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. بطور مثال محمدپور و همکاران در سال ۱۴۰۲، اثر هم‌افزایی آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول و عصاره اتانولی سیاهدانه بر روی سویه‌ی استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس، (Mohammadpour P و همکاران, ۲۰۲۳) اسدی و همکاران در سال ۱۴۰۲، اثر هم‌افزایی سفکسیم و کارواکرول بر روی باکتری اشرشیاکلی (Asadi S و همکاران, ۲۰۲۳)، گریوانی و همکاران در سال ۲۰۲۰، اثر هم‌افزایی آنتی‌بیوتیک اریترومایسین و بزاق زالو بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (Gerivani B و همکاران,۲۰۲۰) و Aelenei P و همکاران در سال ۲۰۱۹، اثر هم‌افزایی عصاره گشنیز با آنتی‌بیوتیک اریترومایسین بر روی سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلی

(Aelenei P و همکاران, ۲۰۱۹)، ثابت کردند. همچنین Vassiliou و همکاران در سال ۲۰۲۳ دریافتند، ترکیب تیمول، کارواکرول و لینالول به همراه کورتیکواستروئیدها، می‌توانند عوارض جانبی مصرف داروهای مصنوعی را کاهش دهد و می‌توان از این ویژگی در جهت کاهش سمیت و عوارض ناشی از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان همزمان آویشن و آنتی‌بیوتیک استفاده کرد (Vassiliou و همکاران, ۲۰۲۳). طبق نتایج این پژوهش‌ها، بررسی اثر هم‌افزایی داروی گیاهی تیماسین‌پلاس® و آنتی‌بیوتیک اریترومایسین، دومین هدف مورد بررسی در این پژوهش بود.

Pingping Jiang و همکاران در سال ۲۰۱۹، برای بررسی تاثیر ضدمیکروبی لاکتوباسیلوس در برابر عفونت سالمونلا تیفی‌موریوم در موش از بافت طحال و کبد برای شمارش تعداد کلنی‌های استفاده کردند (Jiang P و همکاران, ۲۰۱۹). همچنین Soyeon Park و همکاران در سال ۲۰۲۰، از سالمونلا تیفی‌موریوم فاقد YjeK به عنوان واکسن ضعیف شده در برابر عفونت سالمونلا استفاده کردند؛ در این بررسی، برای اندازه‌گیری میزان اثربخشی این واکسن، از کشت سطحی عصاره سلولی رقیق شده بافت کبد و طحال در پپتون واتر در محیط کشت SS Agar استفاده گردید (Park S و همکاران, ۲۰۲۰). عاشوری در سال ۱۳۹۶، برای بررسی اثر عصاره گیاهی، بره‌موم، کوکسیدیواستات و آنتی‌بیوتیک بر سیستم ایمنی، فراسنجه‌های خونی و عملکرد جوجه‌های گوشتی چالش یافته با باکتری اشریشیاکلی میزان یک گرم از بافت کبد، طحال و روده برداشته و پس از رقت سازی در محیط‌های مختلف کشت دادند (Ashoori A,۲۰۱۷).

نتیجه‌گیری

بر اساس مطالعات صورت گرفته و نتایج بدست آمده از این بررسی، ثابت شد شربت گیاهی تیماسین‌پلاس، اثر ضدمیکروبی مشابهی با آنتی بیوتیک اریترومایسین دارد. ضمنا می‌توان از این شربت به‌صورت هم‌افزایی با اریترومایسین در کاهش جمعیت باکتری سالمونلاتیفی‌موریوم استفاده کرد.

تعارض منافع

بین نویسندگان این پژوهش تعارض در منافع گزارش نشده است.

Journal of Veterinary Laboratory Research 14 (2021) 43-55

The effect of the commercial combination of Thymus Vulgaris and Althea Officinalis extracts and the synergistic effect with the antibiotic erythromycin on the microbial population of the liver and spleen tissue of broilers infected with Salmonella typhimurium

Davoodi,Z.[1] , Staji,H.[2]*, Emadi Chashmi,H.[3], Ghaffari Khaligh,S.[4]

Received: 28.03.2021 Accepted: 08.09.2022

Abstract

Salmonella typhimurium is one of the most pathogenic salmonellas that lead to infection in humans, livestock and poultry. Excessive use of antibiotics in order to reduce complications and destroy bacteria in different doses leads to the development of resistance. Therefore, the use of antimicrobial compounds without side effects is considered important.

The present study was conducted to investigate the antimicrobial effect of the combination of two extracts of Thymusvulgaris and Altheaofficinalis and the synergism of this substance with erythromycin on Salmonella typhimurium infection.

For this purpose, 40-day-old chicks of Ras 308 breed were used in four groups. Experimental treatments included negative control, treatment with antibiotics, treatment with TymasinPlus syrup and treatment with antibiotic and TymasinPlus. After induction of infection, on days four and twelve, after death by pity, liver and spleen tissues were isolated and tested.

The results of colony counting proved that TymasinPlus syrup has an antimicrobial effect on Salmonella typhimurium bacteria. The highest number of bacteria was specific to the control group and the lowest amount was related to the group treated with antibiotics and TymasinPlus; It was also found that TymasinPlus commercial syrup has the same function as antibiotics and is effective in reducing the bacterial population synergistically with antibiotics.

It is better to use the herbal medicine TymasinPlus instead of using chemicals when the infection caused by Salmonella typhimurium occurs.

Keywords: Salmonella typhimurium, Antibiotic Resistance, Tymasin Plus® Syrup, Thymus vulgaris, ALthea officinalis.

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 Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.
4- Assistant professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.
*Corresponding author: hstaji@semnan.ac.ir

منابع

بایگان, عباس, صفائیان, شیلا, شاهین فر, خوشخو, ژ. (۲۰۲۰). بررسی اثر آنتی باکتریالی اسانس گیاه کاکوتی کوهی منطقه خراسان شمالی روی باکتری گرم منفی سالمونلا تیفی موریوم در محیط .in vitro مجله علوم و صنایع غذایی ایران, **۱۹(۱۳۰)**, ۳۵۵–۳۷۰.

جهانتیغ, بیگمی, محکمی, س. (۲۰۲۰). بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌های گیاهان دارویی کهورک (Prosopis farcta L.) و تاتوره (Datura stramonium L.) روی سالمونلا تیفی‌موریوم (Salmonella typhimurium) جدا شده از طیور در شهرستان زابل. فصلنامه کیفیت و ماندگاری تولیدات کشاورزی و مواد غذایی, **۱(٦),** ۳۶–۴۵.

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)**, 156–164.

Akermi S, Smaoui S, Fourati M, Elhadef K, Chaari M, Chakchouk Mtibaa A, M. L. (2022). In-Depth Study of Thymus vulgaris Essential Oil: Towards Understanding the Antibacterial Target Mechanism and Toxicological and Pharmacological Aspects. BioMed Research International, **5(8)**.

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)**, 3268–81.

Amenu D. (2016). Antimicrobial activity of medicinal plant extracts and their synergistic effect on some selected pathogens. American Journal of Ethnomedicine, **1(1)**, 18–29.

Amsden GW. (2005). Anti-inflammatory effects of macrolides--an underappreciated benefit in the treatment of community-acquired respiratory tract infections and chronic inflammatory pulmonary conditions? J Antimicrob Chemother, **55(1)**, 10–21.

Arab M, Arab N, Kahrizi D, E. A. (2021). Evaluating Antibacterial Effects of Alcoholic Extracts and Essential Oil of Althaea officinalis Against Two Types of Gram-positive and Gram-negative Bacteria (Bacillus cereus and Klebsiella pneumonia). Journal of Medicinal plants and By-product, **1, 107–115**.

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)**, 67–76.

Ashoori A, B. A. (2017). Comparison the effect of two herbal extracts, Propolis, Antibiotic and Coccidiostat on Immune System, Blood Parameters and Performance of Broiler Chickens Challenged with E. coli. Animal Production, **19(3)**, 685–696.

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, 1–31.**

Balasubramanian D, López-Pérez M, Grant TA, Ogbunugafor CB, A.-M. S. (2022). Molecular mechanisms and drivers of pathogen emergence. Trends in Microbiology, **30(9)**, 898–911.

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)**, 5752–5774.

Eng SK, Pusparajah P, Ab Mutalib NS, Ser HL, Chan KG, L. L. (2015). Salmonella: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. Frontiers in Life Science, **8(3)**, 284–293.

Eshraghi SS, Amin GH, F. S. (2009). Study of antibacterial and phytochemical properties of 12 herb extracts against pathogenic nocardia strains. Veterinary Research & Biological Products, **22(1)**, 62–73.

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, 66–69.

Funk J, **G. W**. (2014). Risk factors associated with Salmonella prevalence on swine farms. Journal of Swine Health and Production, **12(5)**, 246–251.

Galán JE. (2021). Salmonella Typhimurium and inflammation: a pathogen-centric affair. Nature Reviews Microbiology, **19(11)**, 716–725.

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)**, 243–251.

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.

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)**, 191–196.

Jiang P, Yang W, Jin Y, Huang H, Shi C, Jiang Y, Wang J, Kang Y, Wang C, Y. G. (2019). Lactobacillus reuteri protects mice against Salmonella typhimurium challenge by activating macrophages to produce nitric oxide. Microbial pathogenesis, **1(137)**.

Kachur K, S. Z. (2020). The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. Critical reviews in food science and nutrition, **60(18)**, 3042–3053.

Khamees AH, Mutlag SH, Al-Hilli FA, B. A. (2018). Evaluation of antibacterial activity of aqueous and methanol extract of iraqi Althaea officinalis L. flowers on gastrointestinal key pathogens. Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res, **48(2)**, 59–62.

Lateef Al-Awsi, G. R., Alsudani, A. A., & Omran, F. K. (2021). The antibacterial activity of Althaea officinalis L. methanolic extract against some nosocomial pathogens in vitro and in vivo. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, **790(1)**. https://doi.org/10.1088/1755-1315/790/1/012013

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, 40–6.**

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.

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)**, 114–124.

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)**, 13–22.

Mokhtari R, Kazemi Fard M, Rezaei M, Moftakharzadeh SA, M. A. (2023). Antioxidant, Antimicrobial Activities, and Characterization of Phenolic Compounds of Thyme (Thymus vulgaris L.), Sage (Salvia officinalis L.), and Thyme–Sage Mixture Extracts. Journal of Food Quality, 2023.

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)**.

Oladeinde A, Cook K, Lakin SM, Woyda R, Abdo Z, Looft T, Herrington K, Zock G, Lawrence JP, Thomas IV JC, B. M. (2019). Horizontal gene transfer and acquired antibiotic resistance in Salmonella enterica serovar Heidelberg following in vitro incubation in broiler ceca. Applied and Environmental Microbiology, **85(22)**, e01903-19.

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)**, 977–980.

Park S, Jung B, Kim E, Hong ST, Yoon H, H. T. (2020). Salmonella Typhimurium Lacking YjeK as a candidate live attenuated vaccine against invasive Salmonella infection. Frontiers in Immunology, **23(11)**.

Parsaei P, Bahmani M, Naghdi N, Asadi-Samani M, R.-K. M. (2016). A review of therapeutic and pharmacological effects of thymol. Der Pharm. Lett, **8(2)**, 150–154.

Pausan MR. (2022). Marshmallow and its action on inflamed 3D skin model mimicking atopic dermatitis. Planta Medica, **88(15)**, 1474–1480.

Puvača, N., Tufarelli, V., & Giannenas, I. (2022). Essential Oils in Broiler Chicken Production, Immunity and Meat Quality: Review of Thymus vulgaris, Origanum vulgare, and Rosmarinusofficinalis.Agriculture(Switzerland),**12(6)**.https://doi.org/10.3390/agriculture12060874

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 systematic review and meta-analysis. Antibiotics, **11(4)**, 532.

Sánchez-Salazar E, Gudiño ME, Sevillano G, Zurita J, Guerrero-López R, Jaramillo K, C. W. (2020). Antibiotic resistance of Salmonella strains from layer poultry farms in central Ecuador. Journal of applied microbiology, **128(5)**, 1347–1354.

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.**

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)**, 1–7.

Valiei M, Shafaghat A, S. F. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the flower and root hexane extracts of Althaea officinalis in Northwest Iran. Journal of medicinal plants research, **5(32)**, 6972–6980.

Vassiliou, E., Awoleye, O., Davis, A., & Mishra, S. (2023). Anti-Inflammatory and Antimicrobial Properties of Thyme Oil and Its Main Constituents. International Journal of Molecular Sciences, **24(8)**. https://doi.org/10.3390/ijms24086936