دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان
جلد چهارم، شماره اول، ۱۳۹۵
http://ejrr.gau.ac.ir

مطالعه فراوانی، سروتیپ و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سالمونلاهای جدا شده از گوسفندان در استان گلستان، ایران

*سمیه نمرودی[1] و کاظم بهینه[2]
[1]استادیار و [2]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه محیط‌زیست، دانشکده شیلات و محیط‌زیست،
دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان،
تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۲۲

چکیده

سابقه و هدف: سالمونلاها از جنس باکتری‌های گرم منفی استوانه‌ای شکل و از خانواده انتروباکتریاسه، یکی از شایع‌ترین باکتری‌های قابل انتقال از حیوانات به انسان می‌باشند و به‌دلیل تنوع مخازن حیوانی و انتقال آنها از طریق مدفوع یکی از مهمترین و شایع‌ترین بیماری‌های زئونوز را ایجاد می‌کنند. سرووارهای مختلف سالمونلا می‌توانند موجب بروز گاستروانتریت، سپتی سمی و مرگ ناگهانی در انسان‌ها و چارپایان شوند. دام‌های اهلی چون گوسفند و بز که از مهمترین منابع غذایی انسانی می‌باشند، از مخازن اصلی سروتیپ‌های مختلف سالمونلاهای زئونوز می‌باشند. همچنین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سالمونلاها در دهه‌های اخیر تبدیل به یک مشکل نوظهور شده است. هدف نهایی این مطالعه تعیین فراوانی دفع سالمونلا در نمونه‌های مدفوع گوسفندان به ظاهر سالم و سروتیپ و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سالمونلاهای جدا شده در گله‌های روستایی استان گلستان بود.

مواد و روش کار: تعداد ۱۲۰ نمونه مدفوع به‌طور مستقیم از ناحیه رکتوم گوسفندان به‌ظاهر سالم تهیه شد. آلودگی نمونه‌های مدفوع بدست آمده به سالمونلا از طریق کشت میکروبی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، با استفاده از پرایمرهای ژن *inv* A، مورد بررسی قرار گرفت. سروتیپ و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سالمونلاهای شناسایی شده نیز تعیین شد. مطالعات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۰)، صورت

*نویسنده مسئول: snamroodi2000@yahoo.com

گرفت، با استفاده از تست آماری کای اسکوار معنی‌دار بودن آماری داده‌ها مورد بررسی قرار گرفتند و مقادیر P برابر با ۰/۰۵ یا کمتر معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: از ۱۲۰ نمونه مورد بررسی، ۲۰ و ۲۲ نمونه به‌ترتیب به روش کشت میکروبی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آلوده حامل سالمونلا بود. با وجود بالاتر بودن میزان شناسایی سالمونلا به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از روش کشت میکروبی، اختلاف مشاهده شده معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). در این مطالعه تمامی نتایج مثبت با روش میکروبیولوژی، با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نیز تأیید شدند. سروتیپ‌های جدا شده شامل سالمونلا اینتریتیدیس (۶۵ درصد) و سالمونلا تیفی موریوم (۳۵ درصد) بود. میزان آلودگی به سالمونلا در ۲ جنس نر و ماده مشابه بود (P>۰/۰۵). بالاترین میزان دفع سالمونلا در مدفوع گوسفندان مورد مطالعه، در فصل پائیز مشاهده شد (P<۰/۰۵). بیشترین میزان مقاومت در برابر سیپروفلوکسازین (۷۵ درصد)، تتراسایکلین (۶۰ درصد) و استرپتومایسین (۶۰ درصد) بود. همچنین نتایج مطالعه اخیر بیانگر این مطلب است که فورازولیدون آنتی بیوتیک مناسبی می‌باشد زیرا کارایی بالایی بر ضد جدایه‌های سالمونلا نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه اخیر بیان‌گر نقش بالقوه گوسفندان به عنوان حاملین بالقوه سالمونلا می‌باشد و در نتیجه انجام مراقبت‌های لازم در پرورش و مصرف محصولات تهیه شده از این حیوانات در مناطق روستایی توصیه می‌شود. به طور کلی، نتایج به دست آمده بر نیاز به یک سیستم نظارت و پایش بر مقاومت‌های آنتی بیوتیکی نو ظهور در باکتری‌های بیماری‌زا در نشخوارکنندگان و سایر حیوانات تأکید می‌کند.

واژه‌های کلیدی: گوسفند، سالمونلا، استان گلستان

مقدمه

سالمونلا، گرم منفی و از خانواده انتروباکتریاسه، یکی از شایع‌ترین باکتری‌های قابل انتقال از حیوانات و محصولات غذایی بدست آمده از آن‌ها، به انسان می‌باشد که به‌دلیل تنوع مخازن حیوانی و انتقال آن از طریق مدفوع یکی از مهمترین و شایعترین بیماری‌های زئونوز را ایجاد می‌کند. با توجه به مقام دوم بیماری سالمونلوز بین بیماری‌های که از طریق غذای آلوده به انسان و سایر حیوانات منتقل می‌شود، این بیماری یکی از بزرگترین چالش‌های بهداشت عمومی در سراسر دنیا می‌باشد (۲۷).

دام‌های اهلی چون گوسفند که از مهمترین منابع غذایی انسانی می‌باشند، از مخازن اصلی سروتیپ‌های مختلف سالمونلاهای زئونوز بوده و نقش بالقوه و خطرناک این حیوانات، به عنوان حاملین فاقد علائم بالینی، در بسیاری از گزارشات بروز بیماری سالمونلوز غذایی در انسان‌ها ثابت شده است (۳). از طرفی بروز سالمونلوز بالینی و تحت بالینی در دام‌های پرورشی چون گوسفند، به علت کاهش بازده تولید و همچنین هزینه‌های بالای درمان، عامل بروز خسارات اقتصادی فراوان می‌باشد (۲). پرورش گوسفند و بز یکی از منابع اصلی درآمدزا در نواحی روستایی شمال ایران می‌باشد و جمعیت بالایی از گله‌های این حیوانات در مناطق روستایی شمال ایران، بدون رعایت دقیق موازین بهداشتی و در تماس انسان‌ها، وجود دارند. این جمعیت از بیماری‌های مختلفی چون بروسلوز، طاعون نشخوارکنندگان کوچک، آبله گوسفندی و اکتیمای واگیردار رنج می‌برند (۴، ۱۱ و ۱۴).

علائم بالینی متفاوتی چون اسهال، سپتی سمی و سقط بر اثر آلودگی به سروارهای مختلف سالمونلاها در نشخوارکنندگان کوچک گزارش شده است (۵). با وجود اینکه محصولات حاصل از پرورش گوسفند بخش مهمی از منابع غذایی انسانی را در ایران تشکیل می‌دهند، مطالعات صورت گرفته بر سالمونلا در ایران بیشتر بر آلودگی پرندگان و لاشه دام‌ها متمرکز بوده است و تاکنون هیچ‌گونه مطالعه‌ای بر میزان آلودگی نشخوارکنندگان کوچک، چون گوسفند، که در تماس نزدیک با انسان‌ها در مناطق روستایی زیست می‌کنند، در شمال ایران صورت نگرفته است (۱۰).

استفاده بی‌رویه از آنتی بیوتیک‌ها سبب ایجاد باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها شده که این امر به عنوان مشکل بهداشتی – جهانی بزرگی در کنترل و درمان بیماری‌های باکتریایی چون سالمونلوز می‌باشد (۳). از طرف دیگر وجود سویه‌های سالمونلای مقاوم در دام‌های اهلی، محیط‌های کشتارگاهی، دامداری‌ها و غیره سبب انتقال سویه‌های مقاوم به انسان و حیوانات خواهد شد که این موارد سبب بروز خسارت و هزینه‌های بسیار زیادی در جوامع می‌گردد (۲).

راه‌های مختلفی جهت شناسایی سالمونلا وجود دارد و در این بین روش کشت میکروبی و روش‌های مولکولی از دقیق‌ترین و اختصاصی‌ترین روش‌ها معرفی شده‌اند (۳۱). با توجه به اینکه کنترل سالمونلا در میزبانان مختلف تنها در صورت شناخت اپیدمیولوژی بیماری در مخازن مختلف میسر خواهد بود و از طرف دیگر با توجه به استفاده بالا از انواع آنتی بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های نشخوارکنندگان، در این مطالعه به بررسی آلودگی جمعیت گوسفندان بظاهر سالم به باکتری سالمونلا، تعیین سروتیپ و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها پرداخته شد.

روش کار

نمونه‌گیری: با توجه به عدم وجود اطلاعات کافی از میزان شیوع بیماری در جمعیت گوسفندان در شمال ایران، در این مطالعه (۹۴-۱۳۹۳) ضمن ثبت اطلاعاتی چون زمان و مکان نمونه برداری و همچنین جنسیت، از گله‌های پرورش گوسفند در ۵ روستا واقع در اطراف شهرهای علی آباد (بالادست: ۲۵)، کردکوی (النگ: ۲۴)، بندرگز (حسین‌آباد: ۲۳)، فاضل آباد(۲۳) و گرگان (نودیجه: ۲۵)، با شرایط آب وهوایی مشابه، ۱۲۰ نمونه مدفوع بصورت مستقیم از رکتوم تهیه گردید.

کشت میکروبی: کشت و ردیابی سالمونلاها در نمونه مدفوع در ۳ مرحله به شرح زیر انجام گرفت:

۱- غنی‌سازی با استفاده از محیط سلنیت F و راپوپورت

۲- جداسازی با استفاده از محیط‌های آگار انتخابی شامل مک‌کانگی، زایلوز لیزین دزوکسیکولات آگار، سالمونلا-شیگلا آگار و کروم آگار سالمونلا

۳- تعیین هویت با استفاده از آزمون‌های شیمیایی محیط ۳ قندی آهن‌دار، محیط لیزین دکربوکسیلاز آهن دار، محیط اوره آگار، محیط تعیین سولفیدهیدروژن- اندول و حرکت، محیط متیل رد- وژپرویکوئر.

تعیین سروتیپ سالمونلاهای جدا شده: جهت تعیین گروه بعد از تهیه کشت تازه سالمونلاهای جدا شده در محیط کشت سه قندی آهن‌دار، شیرابه غلیظ از سالمونلاهای رشد کرده با سرم فیزیولوژی (۰/۸۵ درصد) تهیه، روی یک لام چند قطره از آنتی‌سرم‌های پلی‌والان پیکری[1] و سوسپانسیون تهیه شده قرار داده شد و واکنش آگلوتیناسیون در برابر چراغ و در زمینه سیاه قرائت شد. زمانی که واکنش آگلوتیناسیون در کمتر از ۲ دقیقه مشاهده می‌شد، واکنش مثبت تلقی می‌گردید و در این حالت آزمایش

1. Somatic= O

با آنتی سرم‌های مربوط به هر کدام از سرگروه‌های موجود در آنتی سرم پلی والان تکرار می‌گردید تا گروه سرمی مشخص گردد. در مرحله بعدی از آنتی‌سرم‌های پلی‌والان تاژکی[1] برای تعیین سروتیپ داخل گروه استفاده شد (۲۹).

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی: ابتدا سالمونلاهای جدا شده در محیط آگار مغذی کشت و در محیط آبگوشت مولر هینتون در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد تا زمانی که کدورت محیط کشت باکتری با کدورت استاندارد مک فارلند یکسان گردید، کشت داده شد. سوسپانسیون تهیه شده با استفاده از سوآب استریل بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس دیسک‌های استریل (شرکت پارس دلتا) آنتی‌بیوتیک‌های: آمپی سیلین، نئومایسین، لینکواسپکتین، استرپتومایسین، فورازولیدون، تتراسایکلین و سیپروفلوکسازین با پنس استریل در سطح محیط قرار گرفته و پلیت‌ها به‌مدت ۲۴–۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از گذشت دوره انکوباسیون، حساسیت، مقاومت نسبی و مقاومت کامل باکتری با توجه به قطر منطقه ممانعت از رشد و اندازه‌گیری آن به وسیله خط‌کش و مقایسه با جدول استاندارد مشخص گردید (۲۳).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[2]: جهت انجام آزمایش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ابتدا نمونه بر محیط سلنیت F کشت داده شده و پس از تهیه سوسپانسیون آب مقطر - باکتری، سوسپانسیون بمدت ۲۰–۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد جوشانده شده و پس از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰، محلول رویی جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد استفاده قرار گرفت.

در این مطالعه از پرایمرهای اختصاصی ژن *inv* A که موجب تکثیر قطعه ۴۲۹ جفت نوکلئوتیدی می‌شود:

F: 5’- GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA-3’
R: 5’-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC-3’

استفاده گردید (۲۴). واکنش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی ۳ دقیقه واسرشت شدن[3] ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲

1. Flagellar = H
2. Polymerase chain reaction
3. Denaturation

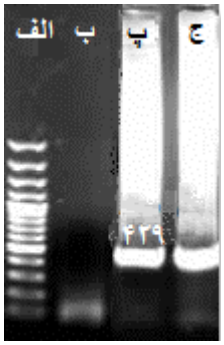
درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه انجام شد. از باکتری سالمونلا تیفی موریوم ATCC14028 و آب مقطر به‌ترتیب به عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده گردید. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید به ژل آگارز ۱/۲ درصد منتقل و پس از الکتروفورز با استفاده از دستگاه ژل داکت تصویربرداری گردیدند.

مطالعات آماری

نمونه‌گیری بصورت تصادفی- مقطعی صورت گرفته و به‌منظور مقایسه نتایج حاصله، نسخه بیستم نرم افزار SPSS و آزمون آماری مربع کای (با معنی دار در نظر گرفتن $P<0.05$) استفاده گردید.

نتایج

در مجموع از میان ۱۲۰ نمونه مدفوع، با روش کشت ۲۰ نمونه (۱۶/۶درصد) و با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، ۲۲ نمونه مدفوع (۱۸/۳ درصد) آلوده به سالمونلا تشخیص داده شد. با وجود بالاتر بودن میزان شناسایی سالمونلا به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از روش کشت میکروبی، اختلاف مشاهده شده معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$). از ۲۰ سالمونلای جدا شده از نمونه‌های مدفوع مورد بررسی در این تحقیق به روش کشت میکروبی، ۱۳ سالمونلا اینتریتیدیس (۶۵ درصد) و ۷ سالمونلا تیفی موریوم (۳۵ درصد) شناسایی شد. در این مطالعه تمامی نتایج مثبت با روش میکروبیولوژی، با روش مولکولی نیز تأیید شدند. در تصویر ۱ نمای الکتروفورز مربوط به ارزیابی ۱ مورد نمونه مدفوع آلوده به سالمونلا نشان داده شده است. تفاوتی در میزان آلودگی به سالمونلا در ۲ جنس نر و ماده مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). بالاترین میزان دفع سالمونلا در مدفوع گوسفندان مورد مطالعه، در فصل پائیز (۲۴ درصد) مشاهده شد ($P<۰/۰۵$) (جدول۱).



شکل ۱: نتیجه محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز = الف: مارکر ۱۰۰ جفت نوکلئوتیدی، ب: کنترل منفی، پ: نمونه سالمونلا مثبت، ج : کنترل مثبت.

Figure 1. Results of PCR = A: 100 bp marker, B: Negative control, P: Positive salmonella sample, J: Positive control.

از مجموع ۲۰ جدایه سالمونلا، ۷۵ درصد نسبت به آنتی بیوتیک سیپروفلوکسازین و۶۰ درصد جدایه‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین و تتراسایکلین مقاوم بوده و بالاترین حساسیت جدایه‌ها نسبت به فورازولیدون مشاهده گردید (P<۰/۰۵، جدول ۲). الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در سروتیپ‌های مختلف باکتریایی متفاوت بود.

جدول ۱- فراوانی میزان آلودگی به سالمونلا بر اساس جنس و فصل نمونه‌گیری با استفاده از روش کشت میکروبی

Table 1. Frequency of salmonella contamination according to gender and season by microbial culture

متغییر (Variable)	تعداد نمونه (Number of samples)	تعداد و درصد نمونه‌های مثبت (Number and percent of positive samples)
جنسیت (Sexuality)	نر (Male): 30	5 (16%)
	ماده (Female): 90	15 (16%)
فصل (Season)	بهار (Spring): 24	4 (16%)
	تابستان (Summer): 37	4 (10%)
	پائیز (Autumn): 33	**8** (24%)
	زمستان (Winter): 26	5 (15%)

جدول ۲- الگوی مقاومت سالمونلاهای جدا شده بر اساس تست آنتی بیوگرام

Table 2. Antibiotic resistance pattern of detected salmonella according to antibiogram test

3	2	1	آنتی‌بیوتیک (Antibiotic)	
(95%) 19	(5%) 1	(0%) 0	(Furazolidone)	فورازولیدون
(25%) 5	(15%) 3	(60%) 12	(Streptomycin)	استرپتومایسین
(35%) 7	(40%) 8	(25%) 5	(Neomycin)	نئومایسین
(40%) 8	(30%) 6	(30%) 6	(Ampicillin)	آمپی‌سیلین
(25%) 5	(15%) 3	(60%)12	(Tetracycline)	تتراسایکلین
(70%) 14	(25%) 5	(5%) 1	(Linco-Specti)	لینکواسپکتین
(5%) 1	(20%) 4	(75%)15	(Ciprofloxacin)	سیپروفلوکسازین

۱- تعداد و درصد سالمونلاهای مقاوم، ۲- تعداد و درصد سالمونلاهای نیمه حساس، ۳- تعداد و درصد سالمونلاهای حساس

1-Number and percent of resistant Salmonella spp, 2-Number and percent of semi sensitive, 3- Number and percent of sensitive Salmonella spp

بحث

نتایج این تحقیق بیانگر آلودگی ۱۸/۳ درصدی جمعیت گوسفندان روستایی به ۲ سروتیپ سالمونلا اینتریتیدیس (۶۵ درصد) و سالمونلا تیفی‌موریوم (۳۵ درصد) بود. از آنجاییکه محل اصلی استقرار سالمونلا در بدن حیوانات، روده می‌باشد، یکی از مناسب‌ترین نمونه‌های بیولوژیکی جهت بررسی آلودگی حیوانات به سالمونلا نمونه مدفوع می‌باشد. گفته می‌شود دوره‌های دفع سالمونلا در حیوانات متناوب بوده و جهت تخمین برآورد دقیق آلودگی به سالمونلا نیاز به حداقل ۳ بار نمونه‌برداری از مدفوع می‌باشد، لذا با توجه به اینکه در این مطالعه تنها امکان یکبار نمونه‌برداری از نمونه مدفوع وجود داشت، احتمال بالاتر بودن میزان آلودگی به سالمونلا در جمعیت مورد مطالعه وجود دارد (۱۸). میزان آلودگی به سالمونلا در ۲ جنس نر و ماده در این مطالعه یکسان بود که با توجه به شرایط نگهداری گوسفندان در گله‌ها و عدم تفاوت نوع تغذیه و فعالیت گوسفندان نر و ماده، چنین نتیجه‌ای قابل انتظار بود.

شیوع فصلی آلودگی به سالمونلا در گونه‌های مختلف حیوانات، بر اساس الگوی رفتاری، متفاوت گزارش شده است. اما با توجه به شرایط مناسب رشد باکتری، دما و رطوبت، بالاتر بودن میزان آلودگی گوسفندان به سالمونلا در فصل پائیز نسبت به سایر فصل‌ها، منطقی به‌نظر می‌رسد (۱۹،۳۰). جداسازی سروارهای مختلف سالمونلا از گوسفندان فاقد علائم بالینی همانند مواردی که در این مطالعه دیده

شد، بیانگر آلودگی بالای محیط به سالمونلاها و همچنین نقش بسیار مهم گوسفندان روستایی در انتشار سالمونلا در مناطق روستایی می‌باشد. همانطور که در بخش نتایج دیده شد میزان شناسایی سالمونلا در نمونه‌های مدفوع با روش کشت نسبت به روش واکنش زنجیره ای پلیمراز به مقدار کمی پائین‌تر بود.

نتایج مطالعات مختلف در راستای مقایسه این دو روش متفاوت بوده است. به عنوان مثال رستگار و همکاران (۲۰۰۹) اختصاصیت و حساسیت دو روش نامبرده را مشابه با مطالعه اخیر تا حدودی مشابه ذکر کرده‌اند (۲۶). از طرف دیگر برخی از محققین چون فدر و همکاران (۲۰۰۱) ضمن گزارش توانایی بترتیب ۴۴ درصد و ۸۰ درصدی روش‌های کشت و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در شناسایی سالمونلا در نمونه آب، اختصاصیت و حساسیت بالاتری را برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز عنوان کرده‌اند(۱۵). با توجه به اینکه ممکن در صورت حضور تعداد کم باکتری سالمونلا در نمونه مدفوع احتمال رشد آن در محیط کشت باکتریایی کاهش یابد و از طرفی با توجه به حساسیت بالای روش‌های مولکولی در شناسایی عوامل بیماریزا حتی با تعداد کم، می توان علت احتمالی بالاتر بودن سالمونلاهای شناسایی شده در نمونه مدفوع به روش PCR را نسبت به روش کشت میکروبی در این تحقیق توضیح داد (۱۸).

ژن *inv* A در ۹۹ درصد سروتیپ‌های مختلف سالمونلا حضور دارد و نه تنها برای سالمونلاها اختصاصی می‌باشد، بلکه حضور آن در سالمونلا بیانگر توان بالقوه بیماریزا بودن باکتری می‌باشد. لذا با وجود عدم مشاهده علائم بالینی سالمونلوز در جمعیت آلوده در این تحقیق، احتمال بروز بیماری سالمونلوز در این حیوانات وجود دارد (۲۲).

با وجود اهمیت بسیار بالای جمعیت نشخوارکنندگان کوچک در گسترش سالمونلا در نواحی روستایی و انتقال آن از طریق آلودگی محیط و مواد غذایی به انسان، مطالعات صورت گرفته بر میزان آلودگی نمونه مدفوع جمعیت گوسفندان روستایی به سالمونلا محدود به مطالعه اسماعیلی و همکاران (۲۰۱۲) در نواحی روستایی بوشهر می‌باشد (۱۲). در این مطالعه میزان آلودگی گوسفندان و بزهای سالم به سالمونلا ۰/۵ درصد گزارش شده است. همچمین در مطالعه صورت گرفته بر آلودگی مدفوع لاشه‌های تازه گوسفندان و بزها در آذربایجان غربی، آلودگی به سالمونلا در ۸ درصد گوسفندان و ۱۶ درصد بزها گزارش شده است (۳۳). گزارشاتی از میزان آلودگی جمعیت گوسفندان در سایر نقاط دنیا وجود دارد. در مطالعه مشابه صورت گرفته بر لاشه ۲۰۴ گوسفند در هند، آلودگی به سالمونلا در

۱۷/۶ درصد نمونه‌های عقده‌های لنفاوی و مثانه بدست آمده، گزارش شده است (۷). در مطالعه صورت گرفته بر میزان آلودگی جمعیت نشخوارکنندگان به سالمونلا در عربستان سعودی، آلودگی ۱۸/۸ درصدی و ۱۳/۵ درصدی بترتیب در جمعیت گوسفند و بز مورد مطالعه بدون مشخص کردن سروتیپ جدایه‌ها، گزارش شده است (۶).

باید دانست تفاوت‌های موجود بین نتایج بررسی حاضر با سایر مطالعات، ضمن اینکه می‌تواند به واسطه اختلافات مدیریتی و اقلیمی حاصل شده باشد، به روش مطالعات فوق نیز وابسته می‌باشد (۱۹). سروتیپ‌های جدا شده از جمعیت گوسفندان روستایی در این تحقیق، سالمونلا اینتریتیدیس و سالمونلا تیفی موریوم، به عنوان مهمترین و شایعترین سروتیپ‌های مسبب سالمونلوز انسانی و حیوانی در دنیا معرفی شده‌اند (۲۰). مطالعات مولکولی بیانگر انتقال سروتیپ‌های مختلف سالمونلا چون سالمونلا براندنبرگ و سالمونلا تیفی موریوم از چارپایان به انسان‌ها بوده است (۸ و۱۶).

با وجود اینکه متاسفانه هیچ‌گونه مطالعه‌ای بر میزان آلودگی جمعیت انسانی در شمال ایران به سالمونلا وجود ندارد، با توجه به عدم رعایت موازین بهداشتی در نواحی روستایی شمال ایران و شرایط مساعد شمال ایران جهت رشد باکتری سالمونلا، می‌توان انتقال سالمونلاها توسط جمعیت گوسفندان به روستاییان و شیوع بالای سالمونلوز تحت بالینی را در نواحی روستایی شمال ایران پیش‌بینی کرد. مطالعات صورت گرفته در جمعیت طیور گوشتی پرورشی و محلی در شمال ایران بیانگر آلودگی این جمعیت به سروتیپ‌های مختلف سالمونلا بوده است و سروتیپ‌های جدا شده از جمعیت گوسفندان روستایی در این مطالعه از جمله شایعترین سروتیپ‌های جدا شده از طیور مطالعه شده در این تحقیقات بوده است (۱۰ و ۲۵).

با توجه به تعداد بالای پرندگان و جابجایی راحت آنها در محیط، پرندگان به عنوان حیواناتی که نقش اصلی را در انتشار سالمونلا در محیط و انتقال آن به سایر گونه‌های حیوانی ایفا می‌کنند معرفی شده‌اند (۳۲). ممکن است منبع اصلی آلودگی گوسفندان مورد مطالعه در این تحقیق پرندگان باشند. البته جهت اثبات این فرضیه نیاز به بررسی مولکولی جدایه‌ها و مقایسه ژنتیک آنها با یکدیگر می‌باشد. متأسفانه در اکثر مطالعات مشابه صورت گرفته در ایران و دنیا سروتیپ سالمونلاهای جدا شده از مدفوع و یا لاشه نشخوارکنندگان کوچک چون گوسفند و بز تعیین نگردیده است. در مطالعه مشابه صورت گرفته بر میزان آلودگی گوسفندان به سالمونلا در استرالیا ضمن گزارش شیوع ۴۶ درصدی آلودگی نمونه مدفوع این حیوانات به سالمونلا، سروتیپ جدایه‌ها سالمونلا سینت پول (۳۱ درصد) و

سالمونلا چستر (۱۱ درصد) و سالمونلا تیفی موریوم (۱۳درصد) تشخیص داده شد (۹). آلودگی ۲/۳۷ درصدی جمعیت گوسفندها در استان‌های مختلف کشور عراق به ۴ سروتیپ سالمونلا تیفی موریوم، سالمونلاهاتو، سالمونلاهاردر و سالمونلا اینتریتیدیس ضمن تعلق بالاترین شیوع، ۷۰/۸۳ درصد، به سالمونلا تیفی موریوم گزارش شده **است** (۲۱). بطورکلی سروتیپ‌های شایع سالمونلا در میزبان‌های حیوانی، در نقاط مختلف دنیا بر اساس فرهنگ غذایی، شرایط آب و هوایی و میزان و نوع آنتی بیوتیک‌های رایج متفاوت می‌باشد (۳۲).

مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌ها یکی از دلایل عدم پاسخ مناسب به درمان با آنتی بیوتیک‌ها و صرف هزینه‌های درمانی بالا در طب پزشکی و همچنین دامپزشکی می‌باشد. در این مطالعه مقاومت بالای جدایه‌های سالمونلا نسبت به سیپروفلوکسازین (۷۵ درصد)، استرپتومایسین (۶۰ درصد) و تتراسایکلین (۶۰ درصد) مشاهده گردید.

حساسیت بالای سالمونلاهای جدا شده در این مطالعه به آنتی‌بیوتیک‌های فورازولیدون بیانگر کاربرد مناسب این داروها جهت درمان عفونت‌های ناشی از سالمونلاهای جدا شده از گوسفندان در این تحقیق می‌باشد. البته با توجه به متفاوت بودن الگوی مقاومتی جدایه‌ها، همچنان انجام آنتی بیوگرام قبل از آنتی‌بیوتیک تراپی در ارجحیت می‌باشد. اطلاعات مربوط به الگوی مقاومتی سالمونلا در میزبانان مختلف در شمال ایران، محدود به الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سالمونلاهای جدا شده از پرندگان گوشتی- پرورش و محلی می‌باشد.

مطالعه ارم و همکارن (۲۰۱۳) بر طیور گوشتی اطراف قائم شهر نشان دهنده بیشترین مقاومت دارویی جدایه‌ها در برابر نالیدیکسیک اسید، فورازولیدون، استرپتومایسین، تتراسایکلین و لینکواسپکتین بوده است (۱۳). در مطالعه رحمانی و همکاران (۲۰۱۳) بالاترین مقاوت آنتی بیوتیکی سالمونلاهای جدا شده نسبت به نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکسازین گزارش شده است (۲۵). همچنین در مطالعه صورت گرفته بر پرندگان محلی در استان شمالی ایران بالاترین مقاومت سالمونلاهای جدا شده نسبت به آمپی سیلین و لینکواسپکتین مشاهده شده است (۱۰). سالمونلاهای جدا شده از جمعیت گوسفندان در هند و عراق بترتیب مقاومت بالایی نسبت به نیتروفورازون و آمپی سیلین نشان داده‌اند (۱ و۷).

الگوی مقاومت آنتی ببوتیکی باکتری‌ها در هر منطقه به زمان بررسی و نوع، میزان و زمان مصرف داروهای ضدباکتریایی متداول، بستگی دارد (۳۲). لازم به ذکر است که آنتی بیوتیک‌هایی که سالمونلاهای جدا شده از میزبانان حیوانی در شمال ایران نسبت به آن مقاومت نشان داده‌اند، از جمله

داروهایی می‌باشند که متأسفانه به وفور در صنعت پرورش دام و طیور استفاده می‌شوند و بنظر می‌رسد عامل بروز مقاومت آنتی بیوتیکی در سالمونلاهای شناسایی شده، می‌تواند ناشی از مصرف بی‌رویه آنتی بیوتیک‌ها باشد. از طرف دیگر آنتی بیوتیک‌هایی چون سیپروفلوکسازین از جمله داروهای موثر و مهم در درمان انواع بیماری‌های انسانی می‌باشند، با توجه به این نکته و ثابت شدن انتقال باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک از طریق محصولات غذایی تهیه شده از دام‌های اهلی، وجود مقاومت آنتی بیوتیکی در سالمونلاهای جدا شده از گوسفندان که از منابع اصلی غذایی می‌باشند، خطر احتمال بروز عدم موفقیت درمان بیماری‌های دامی و انسانی را نشان می دهد (۲۸). با توجه به افزایش رو به رشد باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک و همچنین حساس بودن انسان‌ها در نوزادی و سنین بالا به عفونت به سالمونلاها، انجام مطالعات اپیدمیولوژیک وسیع بر میزان آلودگی جوامع انسانی به سالمونلا بسیار ضروری به نظر می‌رسد (۱۹).

پرورش و مصرف گوشت گوسفند و بز در شمال ایران که دارای دشت‌ها و کوهپایه‌های سبز است، بالا بوده و در بسیاری موارد ذبح این حیوانات در خانه‌های روستایی بصورت سنتی صورت می‌گیرد. آلودگی ۱۸/۳ درصدی جمعیت مورد مطالعه در این تحقیق در کنار این واقعیت که اکثر روستائیان از نقش این حیوانات در انتشار سالمونلا مطلع نمی‌باشند، بیانگر اهمیت کنترل سالمونلا و نقش خطیر جمعیت نشخوارکنندگان کوچک در انتشار سالمونلا در محیط و انتقال آن به انسان‌ها می‌باشد. شواهدی از مهار انتقال سالمونلا از حیوانات به انسان‌ها از طریق شستن دست‌ها بعد از تماس با حیوانات و محیط آلوده وجود دارد، لذا آموزش روستائیان در رابطه با رعایت هرچه بیشتر موازین بهداشتی نقش مهمی در کنترل سالمونلا در روستائیان ایفا خواهد کرد (۱۷).

نتیجه‌گیری کلی

به‌طورکلی نتایج این تحقیق بیانگر آلودگی بالای جمعیت‌های گوسفندان در مناطق روستایی استان گلستان به سالمونلا می‌باشد. قرار دادن اطلاعات حاصل از این مطالعات در اختیار دامداران، دامپزشکان، کارکنان کشتارگاه‌ها و افراد مرتبط با تولید محصولات دامی مسلما نقش پررنگی را در جلوگیری از انتقال این پاتوژن به انسان‌ها و انتشار آن وهمچنین ایجاد سویه‌های مقاوم خواهد داشت. امید آن است با انجام بررسی‌های دیگر و ارایه نتایج و راهکارهای مناسب، شاهد کاهش آلودگی جمعیت‌های دامی به سالمونلا و بروز مقاومت‌های آنتی بیوتیکی در سالمونلاها در آینده نزدیک باشیم.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله کمال تشکر را از جناب آقای مهندس رضا مازندرانی که با راهنمایی سودمندانه‌شان، گره‌گشای مشکلات کار بوده و کمک شایانی در نمونه گیری داشتند ابراز می دارتد.

منابع

1. Afaf, A.Y., Alshemmari, I.G.M., and Mahdi, M.S. 2010. Epidemiological study on *salmonella spp* isolated from goats in some province in middle of Iraq. Vet. Med. 3(1): 27-36.
2. Arruda, S.G.B., Biscontini, T.M.B., and Stamford, T.L.M. 2004. Microbiological characterization of goat meat subjected to different forms of management. Hygiene Alimentar.18(120): 58-62.
3. Baker, M.G., Thrnley, C.N., Lopez, L.D., Garrett, N.K., and Nicol, C.M. 2007. A recurring salmonellosis epidemic in New Zealand linked to contact with sheep. Epidemiol. Infect.135: 76–83.
4. Bazargani, T.T., Charkhkar, S., Doroudi, J., and BaniHassan, E. 2006. A Review on peste des petits ruminants (PPR) with special reference to PPR in Iran. J. Vet. Med. 53(1): 17-18. (In Persian)
5. Blood, D.C., Henderson, A.J., Radosontits, A.J.H., and Gay, C.C. 2007. A text of the diseases of Cattle, horses, sheep, pigs and goats. 9th ed. p. 809-829.
6. 6-Bosilevac, J.M., Gassem, M.A., Sheddy, I.A., Almaiman, S.A., and Al-Mohizea, I.S. 2008. *Salmonella* in Camels, Cattle, Goats, and Sheep harvested for meat in riyadh. J. Food Protection. 1(8): 89-96.
7. Chandra, M., Singh, B.R., Shankar, H., Agarwal, M., Agarwal, R.K., Sharma, G., and Babu, N. 2006. Study on prevalence of Salmonella infection in Goats. Small. Rum. Res. 65(6): 24-30.
8. Dore, K. 2004. Risk factors for *Salmonella typhimurium* DT104 and non-DT104 infection: a Canadian multi-provincial case-control study. J. Epidemiol. Infec.132: 485–493.
9. Duffy, L., Barlow, R., Fegan, N., and Vanderlinde, P. 2000. Prevalence and serotypes of Salmonella associated with goats at two Australian abattoirs. Lett. Appl. Microbiol. 48(2):193-7.
10. Emaddi- Chashni, S.H., Hassanzadeh, M., Bozorgmehri Fard, M.H., and Mirzaie, S. 2009. Characterization of the *Salmonella* Isolates from backyard chickens in North of Iran, by serotyping, multiplex PCR and antibiotic resistance. Arch. Razi Inst. 64(2): 77-83. (In Persian)
11. Esfandyari, B., Mozaffari, A., Asmar, M., and Ebrazeh, N. 2011.Survey on frequency of brucellosis in slaughtered livestock in Amol. Lahijan .J. boil. Sci. 4(2): 12-22. (In Persian)

12. Esmaeili, H., and Sharifi. 2012. Detection of *salmonella spp.* carriers in small ruminant flocks of Bushehr. 2end International congress of Microbiology. Ardebi, Iran.
13. Eram, N., Peighambari, S.M., and Yazdani, A. 2013. Study on *Salmonella spp.* in broiler farms around Ghaemshahr: Determination of serotypes and their drugs resistance. J. Vet. Lab. Res. 5: 85-94. (In Persian)
14. Fallahi, R. Yaghini, M., Kargar Moakhar, R., and Khedmati, K.I. 2012. Virological and serological survey on bluetongue disease in sheep in some parts of Iran. Vet. J. (Pajouhesh & Sazandegi). 99: 36-43.
15. Feder, I., Nietfeld, J.C., Galland, J., Yeary, T., Sargeant, J.M., and Oberst, R. 2001. Comparison of cultivation and PCR-hybridization for detection *Salmonella* in porcine fecal and water samples. J. Clin. Microbiol. 39: 2477-2484.
16. Fone, D.L., and Barker, R.M. 1994. Associations between human and farm animal infections with *Salmonella typhimurium* DT104 in Herefordshire. Communicable Disease Report. CDR Review. 4: 136–140.
17. Friedman, C.R. 1998. An outbreak of salmonellosis among children attending a reptile exhibit at a zoo. J. Pediatrics.132: 802–807.
18. Gentry-Weeks, C., Hutcheson, H.J., Kim, L.M., Bolte, D., Traub-Dargatz, J., and Morley, P. 2002. Identification of two phylogenetically related organisms from feces by PCR for detection of *Salmonella spp.* J. Clin. Microbiol. 40:1487-1492.
19. Greene, E. 2006. Infectious Diseases of the Dog and Cat, 3rd ed. Saunders, St. Louis.818-829.
20. Hendrickson, R.S., Vieira, A.R., Karlsmose, S., Wong, D.M., Jensen, A.B., Wegener, H.C., and Aarestrup, F.M. 2011. Global monitoring of Salmonella serovar distribution World Health Organization Foodborne Infections Network Country Data Bank; results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. Foodborne. Pathol. Dis. 8: 887–900.
21. Mahmood, A.K., Khan, M.S., Khan, M. A., and Bilal, M. 2014. Prevalence of Salmonella in diarrheic adult goats in field condition. J. Ani. Pla. Sci. 24(1): 98-102.
22. Oliveira, S.D., Rodenbuch, C.R., and Micheal, G.B. 2003. Detection of virulence genes in *Salmonella enteritidis* isolated from different sources. Braz. J. Microbiol. 34: 123-124.
23. Quinn, P.J., Carter, M.E., and Markey, B.K. 1994. Clinical Veterinary Microbiology.1 ed Mosby-Year book Europe Limited. Wolfe publishing. London, England, p: 32-50.
24. Rahn, K., De Grandis, S.A., Clarke, R.C., Curtiss, R., and Gyles, C.L. 1992. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonalla typhimurium* by

polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. J. Mole. Cell. Prob. 6: 271-279.

25. Rahmani, M., Peighambari, S.M., Svendsen, C.A.,Cavaco, L.M., Agersø, Y., and Hendriksen, R.S. 2013. Molecular clonality and antimicrobial resistance in *Salmonella enterica serovars Enteritidis* and *Infantis* from broilers in three Northern regions of Iran. BMC Vet. Res. 9: 66-73.
26. Rastegar, M., Ghahraman, M.H., Nishaboori, S.H., and Jalali, M. 2009. Isolation of *Salmonella typhymorium* in milks by microbial culture and PCR. Nut. Sci. Fo. Tech. 3(3): 45-52. (In Persian)
27. Tabaraie, B., Sharma, B.K., Sharma, P.R., Sehgal, N.R., and Ganguly, N.K. 1994. Evaluation of *Salmonella* porins as a broad spectrum vaccine candidate. Microbiol. Immunol. 38: 553-559.
28. Tajbakhsh, M., Hendriksen, R.S., Nochi, Z., Zali, M.R., Aarestrup, F.M., Garcia-Migura. 2012. Antimicrobial resistance in Salmonella spp. recovered from patients admitted to six different hospitals in Tehran, Iran from 2007 to 2008. Folia. Microbiol. (Praha). 57(2):91-7.
29. Waltman, W.D., Gast, R.K., and Mallinson, E.T. 1999. Salmonellosis. In: Swayne, D.E., Glisson, J.R., Jackwood, M.M., Pearson, J.E., Reed, W.M.A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 4th ed., American Association of Avian Pathologists, Pennsylvania, USA. p: 4-13.
30. -Wary, C. and Wary, A. 2000. Salmonella in Domestic Animals. Cabi Publishing, United Kingdom. p: 7-12.
31. Wyatt, G.M., Langley, M.N., Lee, H.A., and Morgan, M.R. 1993. Further study on the feasibility of one-day *Salmonella* detection by enzyme linked immunosorbent assay. Applied. Enviro. Microbiol. 59: 1383–90.
32. Zahrai Salehi, T., Askari Badouei, M., Madadgar, O., Ghiasi, S.R., and Ahrafi Tamai, I. 2013 Shepherd dogs as common source for *Salomonella enterica* serovar *Reading* in Garmsar. Tur J. Vet. Anim. Sci. 37: 102-105.
33. Zare, P., Ghorbani-Choboghlo, H., Jaberi, S., Razzaghi, S., Mirzae, M., and Mafuni, M. 2014. Occurrence and Antimicrobial resistance of *Salmonella spp*. and *Escherichia coli* isolates in apparently healthy slaughtered Cattle, Sheep and Goats in east Azarbaijan province. Int. J. Entric. Pathog. 2(1): 32-41.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Ruminant Research, Vol. 4(1), 2016
http://ejrr.gau.ac.ir

Frequency, Serovars and antibiotic resistant pattern of *Salmonella spp.* isolated from sheep in Golestan province, Iran

***S. Namroodi[1], and K. Behine[2]**
[1]Assistant Prof., and [2]M.Sc. student, Dept. of Environmental Sciences, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
Received: 12/24/2015; Accepted: 06/11/2016

Abstract

Back ground and objectives: *Salmonella spp.*, genus of gram-negative rod-shaped bacteria of the family enterobacteriaceae, are one of the most common bacteria can be transmitted from animals to humans and because of their wide range of reservoirs and transmission by feces origin, is one of the most important and commonest zoonotic disease. *Salmonella spp.* are able to cause severe gastroenteritis, sepsis and occasionally death in humans and livestock. Farm animals such as sheep and goats which are one of the important food sources for humans, can be potential reservoirs of zoonotic *Salmonella spp.* Although, antibiotic resistance in *Salmonella spp.* is an emerging problem during the last decades. The ultimate objective of this study was to determine shedding frequency of *Salmonella spp* in fecal samples of healthy sheep, serotype and antimicrobial resistance pattern of isolated *Salmonella spp* in rural flocks of Golestan Province.

Materials and methods: A total of 120 fecal samples were directly obtained from rectum of apparently healthy sheep. Salmonella contamination of sampled fecal was surveyed by microbial culture and polymerase chain reaction (PCR) assay using primers of the Salmonella *inv* A gene. Serotype and antibiotic resistant pattern of detected salmonella were determined too. The statistical analysis was performed using SPSS, version 20, values were tested for statistical significance using chi-square test and *P value* of 0.05 or less was considered significant.

Results: Out of the total 120 examined animals, 20 (16.6%) and 22 (18.3%) were *Salmonella spp.* carriers by microbial culture and PCR, respectively. In spite of higher detection rate of salmonella with PCR than microbial culture, the difference wasn't significant (P>0.05). In this study, all positive microbial culture results were confirmed with PCR. Serotype of isolates included: 13 (65%) *S. enteritidis* and 7

*Corresponding author: snamroodi2000@yahoo.com

(35%) *S. typhimurium*. Salmonella contamination rate was similar in male and female sheep. Highest Salmonella shedding was observed in autumn. The highest rate of resistance was against Ciprofloxacin (75%), Tetracycline (60%) and Streptomycin (60%). Also results of the current study indicated that Furazolidone is a good antibiotics showing high activity against isolated *Salmonella spp.*

Conclusion: The results of this study confirm the role of sheep as potential Salmonella carriers so it is suggested that caution should be exercised in sheep growth and consumption of foods which are obtained from sheep in rural areas. Overall, the obtained results emphasize the need for a surveillance and monitoring system to emerge drug resistance in pathogenic bacteria in ruminant and other animals.

Keywords: Sheep, Salmonella, Golestan Province