Archive of SID

مجله تخصصی اپیدمیولوژی ایران؛ ۱۳۹۵، دوره ۱۲، شماره ۳: صفحات ۵۵-۴۷.

مقاله پژوهشی

فراوانی آلودگی به سالمونلا در گربه‌های روستایی: بررسی سروتیپ، وجود ژن‌های حدت spv R و spv B و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

سمیه نمرودی[۱]، حمید استاجی[۲]، رضا مازندرانی[۳]

[۱] استادیار، گروه محیط زیست، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

[۲] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

[۳] کارشناس، شبکه دامپزشکی کردکوی، اداره کل دامپزشکی استان گلستان، کردکوی، ایران

نویسنده رابط: سمیه نمرودی، نشانی: گرگان دانشگاه علوم پزشکی تهران، تلفن ۰۹۱۱۳۷۱۱۷۰۰، پست الکترونیک: snamroodi2000@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۵/۱۹؛ پذیرش: ۹۵/۰۲/۰۴

مقدمه و اهداف: گونه‌های سالمونلا عامل یکی از مهم‌ترین بیماری‌های باکتریایی قابل انتقال بین حیوان و انسان در نقاط مختلف دنیا هستند. گربه‌های بدون نشانه‌های بالینی که ممکن است هفته‌ها انواع سالمونلاها را از طریق مدفوع خود دفع کنند؛ می‌توانند نقش مهمی در آلودگی محیط ایفا کنند. هدف از این مطالعه، تعیین نقش گربه‌های روستایی در انتشار گونه‌های باکتری سالمونلا بود.

روش کار: دفع سالمونلا در ۱۷۰ نمونه (سوآب رکتال) به‌دست آمده از گربه‌های به‌ظاهر سالم روستایی در استان‌های گلستان و مازندران، به‌وسیله PCR و آزمون‌های رایج کشت میکروبی مورد بررسی قرار گرفت. پس از سروتایپینگ، حضور ژن‌هایspv R و spv B و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سالمونلاهای جدا شده مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: از ۱۷۰ نمونه بررسی شده، ۲۵ نمونه (۱۴/۷ درصد) به سالمونلا شامل سروارهای اینتریتیدیس (۵۲ درصد)، دابلین (۲۸ درصد) و تیفی‌موریوم (۲۰ درصد) آلوده بودند. حضور ژن‌های حدت spv R و spv B در ۵ سالمونلا از ۲۵ سالمونلای جدا شده در این پژوهش شناسایی شد. بیش‌ترین مقاومت دارویی جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین، لینکواسپکتین و تتراسایکلین دیده شد. تفاوت آماری معنی‌داری در فراوانی آلودگی به سالمونلا در جنس‌های نر و ماده و هم‌چنین بین گربه‌های نمونه‌گیری شده در ۲ استان گلستان و مازندران دیده نشد.

نتیجه‌گیری: شناسایی سالمونلاهای زئونوتیک دارای ژن‌های حدت spv R و spv B و مقاوم به آنتی‌بیوتیک در گربه‌های روستایی بدون نشانه‌های بالینی، بیانگر خطر مهم و بالقوه این حیوانات برای بهداشت عمومی هست. انجام مطالعه‌های مشابه در جمعیت گربه‌ها در راستای اجرای برنامه‌های جلوگیری، کنترل و ریشه‌کنی سالمونلا در مناطق روستایی شمال ایران ضروری به‌نظر می‌رسد.

واژگان‌کلیدی: گربه روستایی، سالمونلا، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ژن‌های حدت spv R و spv B

مقدمه

سالمونلا باکتری گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه و عامل سالمونلوز، یکی از شایع‌ترین بیمارهای قابل انتقال بین حیوانات و انسان و یکی از معضلات بهداشتی در سراسر جهان است. سالمونلاها گروه بزرگی بیش از ۲۶۶۰ سروار را تشکیل می‌دهند و بیش‌تر حیوانات خونگرم و خونسرد را با پراکندگی وسیع جغرافیایی آلوده می‌کنند. حضور ژن‌های spv R و spv B در پلاسمیدهای حدت برای بیماری‌زا شدن سروارهای مختلف سالمونلا ضروری است. بنابراین شناسایی ژن‌های نام برده در جدایه‌های سالمونلا می‌تواند توان بالقوه بیماری‌زا بودن آن‌ها را آشکار می‌سازد (۱).

روش‌های مختلفی با حساسیت و ویژگی بالا برای شناسایی سالمونلا در نمونه‌های مختلف بیولوژیک وجود دارد و در این بین روش کشت میکروبی و استفاده از پرایمرهای عمومی ST11 و ST15 حساسیت و ویژگی بالایی برای شناسایی این باکتری در نمونه مدفوع دارند (۲).

سالمونلا در برابر عوامل فیزیکی محیطی مقاوم بوده و می‌توان آن را از مدفوع حیوانات و یا مواد آلوده به مدفوع، جدا کرد. با توجه به سازگاری سروارهای جدا شده از حیوانات با انسان، بیش‌تر سروتیپ‌های سالمونلای حیوانی برای انسان نیز خطرناک و بیماری‌زا هستند (۳).

مطالعه‌های مختلف در نقاط مختلف دنیا نشان می‌دهد که مصرف مواد غذایی تولید شده از طیور یا آلوده به سالمونلاهای جدا شده از طیور، عامل اصلی رخداد سالمونلوز انسانی هستند. با این وجود سایر حیوانات به‌ویژه حیواناتی مانند گربه‌های ولگرد و

www.SID.ir

Archive of SID

روستایی که در تماس نزدیک با انسان‌ها زندگی و از منابع غذایی آلوده تغذیه می‌کنند؛ نقش مهمی در انتقال سروارهای زئونوتیک به انسان ایفا می‌کنند و در واقع یکی از عوامل اصلی شکست برنامه‌های قرنطینه و ریشه‌کنی سالمونلوز در دنیا هستند (۴).

در صورت آلودگی گربه‌سانان به سروارهای مختلف سالمونلا ممکن است به حاملان بدون علامت بیماری که می‌توانند تا هفته‌ها باکتری را در مدفوع خود دفع کنند؛ تبدیل شوند. از طرفی گفته شده که باکتری از طریق بزاق حیوان نیز دفع و هنگامی که گربه خود را لیس می‌زند؛ سطح بدن آلوده شده و تماس با گربه به‌ظاهر سالم موجب آلودگی خواهد شد (۵).

مقاومت آنتی‌بیوتیکی، یک مشکل رو به افزایش در باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه و سالمونلاها است و مسائل فراوانی را برای درمان آنتی‌بیوتیکی بیماری‌های ناشی از این باکتری‌ها ایجاد کرده است و نه تنها موجب خسارت‌های اقتصادی بزرگی در صنعت پرورش دام و طیور شده، بلکه از جنبه‌ی بهداشت عمومی در انسان نیز دارای اهمیت بالایی است (۶).

گزارش‌های متعددی از انتقال سالمونلاهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک از طریق حیواناتی مانند گربه که در تماس نزدیک با انسان قرار دادند؛ وجود دارد. بنابراین تعیین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی سالمونلاهای جدا شده از این حیوانات می‌تواند اطلاعات با ارزشی در شناسایی داروهای غیر مؤثر و جایگزینی داروهای مناسب و هم‌چنین حفظ بهداشت و سلامت جوامع انسانی فراهم آورد (۷).

به‌نظر می‌رسد با وجود اهمیت سالمونلوز در کودکان و افرادی که با کاهش عملکرد سیستم ایمنی مواجه هستند. به دلیل خودمحدود شونده بودن سالمونلوز در انسان‌هایی که عملکرد بالای سیستم ایمنی دارند؛ سالمونلوز تبدیل به یک بیماری فراموش شده در ایران شده است، و مطالعه‌های انجام شده در این زمینه بیش‌تر مربوط به طیور پرورشی و محلی است (۸).

محدود و کنترل کردن بیماری‌های ناشی از سالمونلا نیاز به کنترل وسیع باکتری در مبتلایان و شناخت حاملان و مخازن اصلی باکتری در هر اکوسیستم دارد.

با توجه به حضور بالا و تماس نزدیک گربه‌های روستایی با روستاییان، حضور بالای پرندگان محلی و مراکز پرورش طیور (به عنوان منبع اصلی آلودگی سالمونلایی سایر حیوانات) در شمال ایران و تماس گربه‌های روستایی به‌طور غیر مستقیم و مستقیم با این حیوانات، عدم رعایت دقیق ضوابط بهداشتی در مناطق روستایی و دفع باکتری سالمونلا از گربه‌های به‌ظاهر سالم، آگاهی از فراوانی آلودگی گربه‌های ولگرد روستایی به سالمونلا، تعیین سروتیپ و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و وجود ژن‌های حدت در سالمونلاهای جدا شده از گربه‌های روستایی در استان‌های شمالی ایران می‌تواند در کنترل و مدیریت سالمونلوز در صنعت پرورش دام و طیور و بهداشت انسانی نقش مهمی داشته باشد.

بنابراین در این مطالعه نمونه مدفوع گربه‌های روستایی به‌ظاهر سالم برای شناسایی و سروتایپینگ باکتری سالمونلا، وجود ژن‌های حدت spv R و spv B و الگوی مقاومت دارویی جدایه‌های سالمونلا مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

نمونه‌گیری

با در نظر گرفتن متوسط آلودگی ۱۲ درصدی گربه‌ها و سطح اطمینان ۹۵ درصد و دقت ۵ درصد، با استفاده از فرمول مطالعه‌های مقطعی نیاز به حدود ۱۷۰ نمونه بود. بنابراین به‌صورت تصادفی از ۱۷۰ قلاده گربه روستایی– ولگرد به‌ظاهر سالم در ۱۷ روستای استان‌های گلستان و مازندران، با شرایط آب و هوایی مشابه و معتدل و مرطوب، طی اردیبهشت ۹۳ تا خرداد ۹۴ با استفاده از تله‌های دست‌ساز نمونه سوآب رکتوم تهیه شد. اطلاعات مربوط به هر حیوان از جمله سن (با استفاده از فرمول دندانی)، جنس، محل نمونه‌گیری و غیره ثبت گردید (۹).

کشت میکروبی و سروتایپینگ

نمونه‌های به‌دست آمده به محیط‌های غنی‌کننده سلنیت F و راپوپورت منتقل و به ترتیب در دماهای ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. پس از غنی‌سازی، کلونی‌های مشکوک به محیط‌های انتخابی مک کانکی XLD، SS و کروم آگار سالمونلا منتقل و به مدت ۳۶-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. از پرگنه‌های مشکوک به سالمونلا نمونه‌گیری و در محیط‌های مختلف افتراقی چون محیط اوره، TSI، آب پپتونه، سیمون سیترات، MR وVP کشت داده شدند و سالمونلا بودن آن‌ها مورد تأیید قرار گرفت.

سروتایپینگ سالمونلاهای جدا شده بر مبنای روش استاندارد آگلوتیناسیون روی لام با استفاده از پادگن‌های O و H صورت گرفت. برای تعیین گروه از کشت ۲۴ ساعته باکتری روی محیط TSI، با استفاده از سرم فیزیولوژی ۹ درصد روی لام شیرابه‌ی غلیظی تهیه و ضمن مخلوط کردن یک قطره آنتی‌سرم، واکنش

www.SID.ir

Archive of SID

اتوآگلوتیناسیون کنترل شد. در صورت مشاهده آگلوتیناسیون در کم‌تر از ۲ دقیقه واکنش مثبت در نظر گرفته شد. در ابتدا با استفاده از آنتی‌سرم‌های پلی‌والان مجموعه گروهی مشخص و سپس از آنتی‌سرم‌های مونووالان متعدد استفاده شد (۱۰).

آزمایش مولکولی PCR

استخراج DNA از طریق جوشاندن ۲-۱ کلونی از کشت باکتری بر محیط لوریا برتانی در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. مایع حاصل با دور ۱۲ هزار rpm سانتریفیوژ شده و مایع رویی برای PCR مورد استفاده قرار گرفت.

از پرایمراهای یونیورسال ST11 و ST15 (۱۱) برای جداسازی سالمونلا در حد جنس، و از پرایمرهای ژن spv R (۱۲) و ژن spv B (۱۳) برای بررسی ژن حدت پلاسمیدی در جدایه‌های سالمونلا با استفاده از سیکل‌های حرارتی بیان شده در جدول شماره ۱ استفاده شد. در این مطالعه از آب مقطر به عنوان کنترل منفی و از سالمونلا تیفی‌موریوم ATCC14028 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

جدول شماره ۱- ردیف پرایمرها، برنامه PCR و محصول تکثیر یافته مورد نظر

ژن	توالی نوکلئوتیدی	برنامه حرارتی- زمانی	محصول PCR بر اساس bp
Spv R	5' CAGGTTCCTTCAGTATCGCA 3' 5' TTTGGCCGGAAATGGTCAGT 3'	واسرشت‌سازی: ۳۰ ثانیه در 0C ۹۵ اتصال: ۳۰ ثانیه در 0C ۵۶ گسترش:۷۰ ثانیه در 0C ۷۲	۳۱۰
Spv B	5' CTATCAGCCCCGCACGGAGAGCAGTTTTTA 3' 5' GGAGGAGGCGGTGGCGGTGGCATCATA 3'	واسرشت‌سازی: ۳۰ ثانیه در 0C ۹۴ اتصال: ۳۰ ثانیه در 0C ۶۶ گسترش: ۲ دقیقه در 0C ۷۲	۷۱۷
random sequence (ST 11 , ST 15)	5'GCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA 3' 5'GTAGAAATTCCCAGCGGGTACTGC 3'	واسرشت‌سازی: ۳۰ ثانیه در 0C ۹۴ اتصال: ۴۵ دقیقه در 0C ۷۲ گسترش: ۳۰ ثانیه در 0C ۷۲	۴۲۹

محصولات حاصل از PCR روی ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز شده و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید با دستگاه ژل داکت عکسبرداری شده و مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین الگوی مقاومت دارویی

از روش کیفی دیسک دیفوژن با روش استاندارد برای تعیین الگوی مقاومت دارویی نسبت به ۸ آنتی‌بیوتیک: آمپی‌سیلین (Am)، نئومایسین (N)، لینکواسپکتین (Ls)، استرپتومایسین (St)، نالیدیکسیک اسید (Na)، فورازولیدون (F)، تتراسایکلین (Tt) و فلورفنیکل (Ff) استفاده شد. به این صورت که ابتدا از پرگنه‌های مربوط به جدایه‌های سالمونلا در محیط TSB برای مدت چند ساعت کشت شده و سپس از آن‌ها تعلیقی با کدورت معادل کدورت لوله ۰/۵ مک فارلند تهیه می‌شد و در مرحله بعد، از تعلیق فوق در سطح محیط مولر هینتون آگار توسط سوآب استریل کشت شده و دیسک‌های مربوط Am (10 µg)، N(30 µg)، LS(15/200 µg)، St (10 µg)، Na(30 µg)، F(30 µg)، Tt(30 µg) و Ff(30 µg) در سطح آگار قرار گرفته و پس از ۲۴ ساعت هاله‌های ناشی از عدم رشد باکتری با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شده و نتایج مورد بررسی قرار می‌گرفت (۱۴،۱۵).

تجزیه‌وتحلیل آماری

ارتباط متغیرهایی چون سن، محل زندگی و جنس با آلودگی گربه‌های روستایی نمونه‌گیری شده در این پژوهشی به سالمونلا با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ و آزمون مربع کای با سطح معنی‌داری $P\leq0.05$ مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها

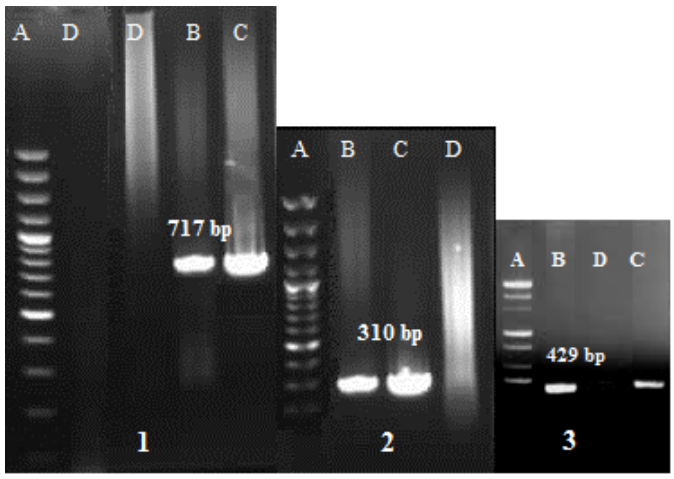
در این مطالعه با استفاده از پرایمرهای یونیورسال ST11 و ST15، از مجموع ۱۷۰ نمونه سوآب مدفوع تهیه شده از گربه‌های ولگرد روستایی، ۲۵ نمونه برابر با فراوانی ۱۴/۷ درصد، آلوده به سالمونلا تشخیص داده شد (تصویر شماره ۱). تعداد سالمونلاهای جدا شده از مدفوع با استفاده از روش PCR (۲۵/۱۷۰) نسبت به

www.SID.ir

Archive of SID

روش کشت میکروبی (۲۴/۱۷۰) کمی بالاتر بود، اما تفاوت معنی‌دار نبود (P> 0.05). از ۲۵ سالمونلای جدا شده، ۱۳ مورد سروار اینتریتیدیس، ۷ مورد سروار دابلین و ۵ مورد سروار تیفی‌موریوم بودند. با استفاده از روش PCR در ۵ جدایه سالمونلا شامل ۳ سروتیپ تیفی‌موریوم و ۲ سروتیپ اینتریتیدیس، ژن‌های حدت spv R و spv B شناسایی شدند (تصویر شماره ۱). از مجموع ۲۵ نمونه، ۶۸ درصد جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین و ۶۴ درصد نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های لینکواسپکتین و تتراسایکلین مقاوم بودند (جدول شماره ۱).

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سروتیپ‌های مختلف باکتریایی متفاوت بود. پراکندگی سنی گربه‌های نمونه‌گیری شده به‌صورت ۳ گروه بوده و بیش‌ترین آلودگی در گربه‌های زیر ۲ سال مشاهده شد. در این مطالعه از ۷۰ گربه نمونه‌گیری شده از ۷ روستای استان گلستان و ۱۰۰ گربه نمونه‌گیری شده از ۱۰ روستای استان مازندران به‌ترتیب تعداد ۱۰ (۱۴/۲ درصد) و ۱۵ (۱۵ درصد) گربه روستایی به سالمونلا آلوده بودند. تفاوت آماری معنی‌داری در فراوانی آلودگی گربه‌های ۲ استان گلستان و مازندران و هم‌چنین بین جنس‌نر و ماده دیده نشد (P> 0.05) (جدول شماره ۲).



تصویر شماره ۱– نتیجه محصول PCR با پرایمرهای ژن spv R (شماره ۱) ، ژن spv B (شماره ۲) و ژن یونیورسال (ST11 و ST15=۳): A: DNA مارکر bp ۱۰۰، B: کنترل مثبت، C: نمونه D: کنترل منفی.

جدول شماره ۲– فاکتورهای مرتبط با گربه‌های روستایی و آلودگی به سالمونلا

فاکتورهای مرتبط با گربه‌های روستایی	تعداد گربه‌های مورد مطالعه	تعداد جدایه های سالمونلا (٪)	*p*
جنس			
نر	۶۹	۱۰ (۱۴/۴)	۰/۸۸
ماده	۱۰۱	۱۵ (۱۴/۸)	
سن			
≤۲	۵۴	۱۰ (۱۸/۵)	۰/۴۸
۵-۲	۶۵	۷ (۱۰/۷)	
≥۵	۵۱	۸ (۱۵/۶)	
محل نمونه‌گیری			
استان گلستان	۷۰	۱۰ (۱۴/۲)	۰/۹۴
استان مازندران	۱۰۰	۱۵ (۱۵)	
روش شناسایی			
کشت میکروبی	۱۷۰	۲۴ (۱۴/۱)	۰/۳۴
PCR	۱۷۰	۲۵ (۱۴/۷)	

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۳ – الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سالمونلاهای جدا شده بر اساس سروار

سروار / آنتی‌بیوتیک	Ls	Tt	St	Na	N	F	Ff	Am
S enteritidis (N: 13)	۳S:	۲S:	۰S:	۲ S:	۳S:	۱S:	۱S:	۳ S:
	۱I:	۲I:	۳I:	۱۰I:	۱۰I:	۱۲I:	۱۲I:	۹I:
	۹R:	۹R:	۱۰R:	۱R:	۰R:	۰R:	۰R:	۱R:
S dublin (N: 7)	۳S:	۲S:	۳S:	۴S:	۴S:	۶S:	۵S:	۱S:
	۱I:	۱I:	۰I:	۲I:	۲I:	۱I:	۲I:	۵I:
	۳R:	۴R:	۴R:	۰R:	۰R:	۰R:	۰R:	۱R:
S typhymurium (N: 5)	۱S:	۰S:	۲S:	۴S:	۵S:	۳S:	۰S:	۱S:
	۰I:	۲I:	۰I:	۱I:	۰I:	۲I:	۵I:	۴I:
	۴R:	۳R:	۳R:	۰R:	۰R:	۰R:	۰R:	۰R:

N: تعداد، S : حساس، I: مقاومت نسبی، R : مقاوم

بحث

با وجود اهمیت بسیاری از حیوانات به‌ویژه گوشتخواران در انتشار سالمونلا، به عنوان حاملان بدون نشانه‌های بالینی، بیش‌تر مطالعه‌های انجام شده در ایران و سایر کشورهای دنیا بر آلودگی جمعیت‌های طیور به سالمونلا متمرکز بوده است. بنا بر اطلاعات نویسندگان، این مطالعه با وجود اهمیت بالای گربه‌های روستایی ولگرد و بدون نشانه‌های بالینی در انتشار سالمونلا، نخستین مطالعه صورت گرفته در جمعیت گربه‌ها در شمال ایران است (۱۶،۱۷).

دفع سالمونلا از طریق مدفوع رایج‌ترین مسیر آلودگی محیط، آب و غذا به سالمونلا بوده و مناسب‌ترین روش جستجوی باکتری، اخذ نمونه مدفوع است و اساس بسیاری از پژوهش‌های مشابه این مطالعه بوده است (۱۶،۱۷). با این وجود به علت دفع غیر مدام و متناوب باکتری سالمونلا از مدفوع برای بررسی دقیق فراوانی آلودگی حاملان لازم است با فاصله‌های زمانی مناسب چندین بار نمونه‌گیری از حیوانات به‌عمل آید (۱۸). بنابراین با توجه به این‌که در این مطالعه تنها امکان یکبار نمونه‌گیری از گربه‌های روستایی- ولگرد فراهم بود؛ فراوانی دقیق دفع سالمونلا توسط گربه‌های روستایی باید بالاتر از ۱۴/۷ درصد باشد.

فراوانی آلودگی گربه‌های روستایی- ولگرد به سالمونلا در استان‌های مازندران و گلستان مشابه بود که با توجه به شباهت آب و هوایی روستاهای انتخاب شده در این پژوهش، این یافته قابل انتظار بود. در این مطالعه از ۲ روش کشت میکروبی و PCR برای شناسایی سالمونلا در نمونه مدفوع استفاده شد و تفاوت آماری معنی‌داری در یافته‌های حاصل از این دو روش مشاهده نشد ($P> 0.05$). با وجود تفاوت نسبی گزارش شده در حساسیت دو روش ذکر شده، یافته‌های حاصل از برخی مطالعه‌های مشابه نیز همانند این مطالعه، بیانگر تطابق بالای بین نتایج این ۲ روش بوده است (۲).

در بیش‌تر مطالعه‌های صورت گرفته بر فراوانی آلودگی گونه‌های مختلف حیوانات و انسان‌ها به سالمونلا متغیر جنس بررسی نشده و در مواردی که آلودگی در یک جنس بالاتر شناسایی شده است؛ تفاوت مشاهده شده به تفاوت ویژگی‌های رفتاری جنس نر و ماده در آن گونه نسبت داده شده است. در این مطالعه تفاوت آماری معنی‌داری در میزان آلودگی ۲ جنس نر و ماده دیده نشد و به‌نظر نمی‌رسد جنس تأثیری در فراوانی آلودگی گربه‌های روستایی به سالمونلا داشته باشد (۱۸).

سروارهای شایع سالمونلا و فراوانی آلودگی در جمعیت‌های گربه‌های نقاط مختلف دنیا متفاوت هستند. بیش‌تر مطالعه‌های انجام شده در گربه‌های دارای نشانه‌های بالینی سالمونلوز بوده و متأسفانه مطالعه‌های اپیدمیولوژیک مشابه در سراسر دنیا محدود هستند.

نخستین مطالعه مشابه صورت گرفته در ایران توسط شیمی و برین در سال ۱۹۷۷ میلادی در تهران روی ۱۶۰ گربه بدون صاحب و ۱۴۱ گربه خانگی صورت گرفت. فراوانی آلودگی به سالمونلا در گربه‌های بدون صاحب و خانگی به‌ترتیب ۹/۴ و ۱۸/۴ درصد بوده و سروار غالب جدا شده از گربه‌های بدون

www.SID.ir

Archive of SID

صاحب تیفی‌موریوم بود (۱۹).

در سایر مطالعه‌های اپیدمولوژی مشابه صورت گرفته شیوع ۲ درصدی سروار ژوهانسبرگ در گربه‌های خانگی جزیره‌ی ترینیداد اطراف آفریقای جنوبی، آلودگی ۰/۸ درصدی گربه‌های خانگی در نیویورک، آلودگی ۱۰/۵ درصدی گربه‌ها در سودان، شیوع ۱۰/۱۶ درصدی سرووارهای آناتوم (۳/۳۸ درصد)، مونتویدئو (۳/۳۸ درصد)، تیفی‌موریوم (۱/۶۹ درصد) در گربه‌های ولگرد شهر موصل در عراق گزارش شده است (۲۳-۲۰). هیل و همکاران آلودگی به سالمونلا را در گربه‌های صاحب‌دار ۱۰/۱ و در گربه‌های بدون صاحب ۱۸/۲ درصد گزارش کردند (۲۴). ممکن است گربه‌ها به سرووارهای مختلف سالمونلاها آلوده شوند. ابتلای یک قلاده گربه‌ی خانگی مبتلا به لنفوسارکوما به سالمونلا انتریتیدیس در در ایالات متحده آمریکا گزارش شده است (۲۵).

در مطالعه وبر و همکاران (۲۶) و هم‌چنین فیلبی و همکاران (۲۷) متداول‌ترین سروار شناسایی شده در جمعیت گربه‌های مورد مطالعه تیفی‌موریوم بوده است.. استیور و همکاران در آمریکا آلودگی به سالمونلا نیوپورت را عامل مرگ ۲ قلاده گربه تلف شده بر اثر عفونت سیستمیک گزارش کردند (۲۸).

به‌طور کلی گفته می‌شود که میزان شیوع آلودگی به سالمونلا در گربه‌ها ۱۸-۰ درصد است (۲۸). واقعیت این است که جداسازی سالمونلا حتی با فراوانی پائین همانند آن‌چه در این مطالعه دیده شد؛ نیز یادآور نقش مهم گربه‌های روستایی و ولگرد در انتشار سالمونلا و انتقال آن به انسان‌ها هست.

در مجموع بر اساس یافته‌های این پژوهش، فراوانی آلودگی به سالمونلا در گربه‌های مطالعه شده، در مقایسه با سایر مطالعه‌های مشابه، از رقم بالایی برخوردار است.

جداسازی بیش‌تر سالمونلا از گربه‌های روستایی در این مطالعه نسبت به یافته‌های مطالعه‌های اشاره شده در گربه‌های خانگی می‌تواند در نتیجه دامنه حرکتی بالای این حیوانات در محیط، آلودگی به سالمونلا با مصرف آب و خاک آلوده به مدفوع سایر حیوانات بیمار یا مصرف گوشت پرندگان و حیوانات آلوده، در نواحی روستایی باشد. از طرفی روش به‌کار برده شده در پژوهش‌های مختلف برای شناسایی باکتری، فراوانی آلودگی محیط به سالمونلا و سن حیوانات نمونه‌گیری شده از جمله عواملی هستند که می‌توانند بر میزان شباهت و تفاوت‌های یافته‌های مطالعه‌های مشابه با یافته‌های این مطالعه اثر بگذارند.

همان‌گونه که دیده می‌شود سرووارهای مختلف سالمونلا از گربه‌های آلوده جدا شده است. سروار غالب در مناطق مختلف و در بازه‌های زمانی متفاوت بسته به حاملان اصلی، مقدار استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و تراکم جمعیت میزبان‌های مختلف سالمونلا می‌تواند متفاوت باشد (۱۶).

با توجه به این‌که مطالعه‌های مشابه صورت گرفته در شمال ایران محدود است؛ در مورد منبع آلودگی گربه‌های آلوده در این پژوهش سخن قاطع نمی‌توان گفت.

در مطالعه صورت گرفته توسط عمادی و همکاران در پرندگان محلی- روستایی در شمال ایران آلودگی بالای این پرندگان به سرووارهای تیفی‌موریوم و اینتریتیدیس گزارش شده است (۱۷).

با توجه به شباهت جدایه‌های این پژوهش به سالمونلاهای جدا شده از طیور محلی- روستایی شمال ایران و هم‌چنین با توجه به این‌که گفته می‌شود عامل اصلی انتشار سالمونلا در محیط طیور و محصولات وابسته به آن‌ها هستند؛ می‌توان این پرندگان را یکی از منابع سالمونلا تیفی‌موریوم و سالمونلا اینتریتیدیس جدا شده از گربه‌های روستایی در این پژوهش معرفی کرد (۱۷).

در مطالعه انجام شده در سوئد، پرنده‌های وحشی به عنوان عامل اصلی رخداد سالمونلوز اپیدمیک بر اثر سالمونلا تیفی‌موریوم در انسان‌ها و گربه‌ها معرفی شدند (۳۰).

تاکنون هیچ گزارش مبنی بر جداسازی سالمونلا دابلین از گربه‌ها در ایران وجود نداشته است. فیلبی و همکاران در انگلستان این باکتری را از گربه‌های سالم و دارای نشانه‌های بالینی سالمونلوز جدا کردند (۳۱).

با توجه به این‌که گاوها میزبان اختصاصی سالمونلا دابلین هستند و از طرفی حضور بالای این حیوانات در نواحی روستایی شمال ایران، ممکن است منبع اصلی آلودگی گربه‌های روستایی به این سروار، جمعیت گاوهای روستایی باشد.

انجام مطالعه‌های مولکولی برای یافتن ارتباط سالمونلاهای جدا شده از گربه‌های نمونه‌گیری شده در این پژوهش و سالمونلاهای جدا شده از طیور و گاوها برای شناسایی قطعی منبع آلودگی، ضروری به‌نظر می‌رسد.

در این مطالعه، بیش‌ترین فراوانی آلودگی در گربه‌های زیر ۲ سال و جوان مشاهده شد. در مطالعه صورت گرفته در انگلستان نیز بیش‌ترین فراوانی آلودگی در گربه‌های جوان که سن پایین‌تر از ۶ ماه داشتند؛ دیده شد. ایمرسل و همکاران نیز یافته‌های مشابه را گزارش کردند. گفته می‌شود عدم کارایی عملکرد سیستم ایمنی در حیوانات جوان موجب آلودگی بیش‌تر آن‌ها نسبت به مسن‌ترها به سالمونلا می‌شود (۳۱،۳۲).

ژن‌های حدت spv R و spv B برای ایجاد حدت و مقاومت

www.SID.ir

Archive of SID

دارویی و انتشار و عمومی شدن سالمونلا در بدن میزبان (انسان و حیوان) ضروری است. سروارهای سالمونلا به‌ویژه تیفی‌موریوم و انتریتیدیس که حامل پلاسمیدهای دارای ژن حدت هستند؛ می‌توانند بیماری سیستمیک ایجاد کنند؛ در حالی که گونه‌های بدون ژن حدت می‌توانند بیماری موضعی یا بدون علامت ایجاد کنند (۳۳).

با وجود عدم مشاهده نشانه‌های بالینی سالمونلوز در گربه‌هایی که آلوده به سالمونلا بودند، با توجه به اهمیت فعالیت این دو ژن در کنار یکدیگر برای ایجاد فنوتیپ حدت به نظر می‌رسد جدایه‌های جدا شده در این مطالعه در توسعه‌ی سالمونلوز سیستمیک که بسیار خطرناک‌تر از یک سالمونلوز محدود و گوارشی است؛ مؤثر باشند.

نخستین مطالعه‌ی مشابه صورت گرفته در ایران که در آن حضور ژن‌های حدت بررسی شد، توسط امینی و همکاران صورت گرفت. در این مطالعه حضور ژن spv B در ۱۰۰-۸۸ درصد سالمونلاهای جدا شده از انسان‌ها، پرندگان و گاوها گزارش شد (۳۴).

مطالعه‌های متعدد صورت گرفته بر ژن‌های حدت سالمونلاهای جدا شده از انسان‌ها و حیوانات در نواحی مختلف بیانگر این مطلب بوده است که میزان ردیابی این ژن‌ها در مطالعه‌های مختلف بر اساس نوع سروارها، مقدار استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و بهداشت عمومی متفاوت بوده و وجود چنین اختلاف‌هایی طبیعی می‌باشد (۳۴).

با توجه به استفاده بالای آنتی‌بیوتیک در صنعت طیور پرورشی و وجود گزارش‌هایی مبنی بر جداسازی سالمونلاهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک از پرندگان و حیوانات، مشخص شدن نقش گونه‌های مختلف جانوری در انتشار و اپیدمیولوژی سالمونلاهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک نقش بسیار مهمی در کنترل و مدیریت بیماری ایفا می‌کند (۳۲،۳۳).

سالمونلاهای جدا شده از گربه‌های روستایی در این پژوهش مقاومت بالایی را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین، لینکواسپکتین و تتراسایکلین نشان دادند و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی متفاوتی بین سروارهای جدا شده مشاهده شد. لازم به ذکر است آنتی‌بیوتیک‌های نام برده مصرف بالایی در صنعت پرورش طیور و طب انسانی دارند.

در مطالعه مشابه صورت گرفته توسط ایمرسیل و همکاران مقاومت آنتی‌بیوتیکی سالمونلاهای جدا شده از گربه‌ها نسبت به آمپی سیلین، کلرامفنیکل، سولفامید، تتراسایکلین و سولفامتوکسازول تریمتوپریم گزارش شده است. در این مطالعه همچون مطالعه اخیر الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سروارها مختلف با یکدیگر متفاوت بود (۳۲).

نورمند و همکاران جداسازی سالمونلاهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها را از گربه‌های شهری و روستایی گزارش کردند. هم‌چنین داویس و استوارد انتقال سالمونلای مقاوم به آنتی‌بیوتیک را از گربه‌های خانگی به صاحبان آن‌ها را اثبات کردند (۳۵،۳۶).

الگوی مقاومت دارویی در هر منطقه با توجه به زمان بررسی و نوع، میزان و زمان مصرف داروهای ضدباکتریایی متداول متفاوت است (۱۶).

جداسازی سالمونلاهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک از گربه‌های روستایی بیانگر نقش مهم این حیوانات در گسترش سالمونلاهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک و انتقال آن‌ها به انسان‌ها و سایر حیوانات مستعد است و اهمیت انجام تست آنتی‌بیوگرام پیش از تجویز آنتی‌بیوتیک را در درمان سالمونلوز آشکار می‌سازد.

هیچ‌گونه مطالعه اپیدمیولوژیک مشابه روی سروارهای شایع و الگوی مقاومت دارویی سالمونلا در جمعیت‌های انسانی در شمال ایران صورت نگرفته و در این میان مطالعه‌هایی که رابطه‌ی بین سالمونلاهای شایع در طیور، سگ‌ها و گربه‌ها را با وجود ارتباط بالای آن‌ها با انسان مشخص کرده باشند، وجود ندارد. بنابراین برای مشخص شدن مسیر انتقال سالمونلاها از منابع حیوانی به انسان‌ها و شناسایی نقش حیوانات در رخداد سالمونلوز انسانی، انجام مطالعه‌های مشابه در جمعیت‌های انسانی برای پیشگیری و مدیریت هرچه بهتر سالمونلور در شمال ایران توصیه می‌شود.

به نظر می‌رسد آشنا ساختن روستائیان با چگونگی انتقال سالمونلا از طریق مدفوع و تماس با گربه‌ها و اهمیت رعایت بهداشت عمومی، مدر کنترل بیماری ضروری باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله کمال تشکر را از صبوری و کمک بسیار زیاد دکتر آیت‌الله نصرالهی و روستاییان ساکن در مناطق مورد مطالعه که نقش شایانی در تهیه نمونه داشته‌اند، ابراز می‌دارند.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1. Zahraei Salehi T, Mahzounieh M, Khaksar E. Detection of Salmonella serovars in zoo and pet reptile, rabbits and rodents in Iran by culture and PCR methods. Comparative Clinical Pathology. 2010; 19: 199-202.
2. Rastegar M, Ghahraman MH, Nishaboori SH, Jalali M. Isolation of Salmonella typhymorium in milks by microbial culture and PCR. Nutrient Science Food Technology. 2009; 3: 45-52.
3. Gas RK, Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE. Salmonella infection. 12th ed. Blackwell Publishing, Iowa, USA, 2008; 636-65.
4. Zhang J, Wei L, Kelly P, Freeman M, Jaegerson K, Gong J, et al. Detection of Salmonella spp. using a generic and differential FRET-PCR. Plos One 2013; 8: 1-6.
5. Hill SL, Cheney JM, Taton-Allen GF, Reif JS, Bruns C, Lappin MR. Prevalence of enteric zoonotic organisms in cats. Journal of American Veterinary Medicine Association. 2000; 216: 687–92.
6. Faldynova M, Pravcova M, Sisak F, Havlickova H, Kolackova,I, Cizek A, et al. Evolution of antibiotic resistance in Salmonella enterica serovar typhimurium strains isolated in the Czech Republic between 1984 and 2002. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 2003; 47: 202–5.
7. Sanchez S, Hofacre CL, Lee MD, Maurer JJ, Doyle MP. Animal sources of salmonellosis in humans. Journal of American Veterinary Medicine Association 2002; 221: 492-7.
8. Oosterom J. Epidemiological studies and proposed preventive measures in the fight against human salmonellosis. International Journal of Food Microbiology. 1991; 12: 41 -51.
9. Hoskins JD. Canine Viral Enteritis. In: Greene, C.E. . Infectious diseases of the dog and cat. 3rd ed. Saunders Elsevier Inc, 2006; 40-45.
10. Waltman WD, Gast RK, Mallinson ET. Salmonellosis. In: Swayne DE, Glisson JR, Jackwood MM, Pearson JE, Reed WM. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 4th ed., American Association of Avian Pathologists, Pennsylvania, USA, 1999; 4-13.
11. Soumet C, Ermel G, Rose V, Rose N, Drouin P, Salvat G, Colin P. Identification by a multiplex PCR based assay of Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis strains from environmental swabs of poultry houses. Applied Microbiology. 1999; 29: 1-6.
12. Pasmans F, Martel A, Boyen F, Vandekerchove D, Wybo I, Immerseel FV, et al. Characterization of Salmonella isolates from captive lizards. Veterinary Microbiology. 2005; 110: 285-91.
13. Gulig PA, Danbara H, Guiney DG, Lax AJ, Norel F, Rhen M. Molecular analysis of spv virulence genes of the Salmonella virulence plasmid. Molecular Microbiology. 1993; 7(6); 825-30.
14. Kiehlbauch JA, Hannett GE, Salfinger M, Archinal W, Monserrat C, Carlyn C. Use of the National Committee for Clinical Laboratory Standards guidelines for disk diffusion susceptibility testing in New York state laboratories. Journal of Clinical Microbiology. 2000; 38: 3341-48.
15. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2014; 34; M100-S24.
16. Eram N, Peighambari SM, Yazdani A. Study on Salmonella spp. in broiler farms around Ghaemshahr: Determination of serotypes and their drugs resistance. Journal of Veterinary Laboratory Research. 2013; 5: 85-94.
17. Emadi Chashni SH, Hassanzadeh M, Bozorgmehri Fard MH, Mirzaie S. Characterization of the Salmonella isolates from backyard chickens in North of Iran, by Serotyping, Multiplex PCR and Antibiotic Resistance. Archives of Razi Institute 2009; 64: 77-83.
18. Gentry-Weeks C, Hutcheson HJ, Kim LM, Bolte D, Traub-Dargatz J, Morley P, et al. Identification of two phylogenetically related organisms from feces by PCR for detection of Salmonella spp., Journal of Clinical Microbiology. 2002; 40: 1487-92.
19. Shimi A, Barin A. Salmonella in cats. J. Comp. Path. 1977; 87: 315-18.
20. Seepersadsingh N, Abiodun A, Adesiyun, Seebaransingh R. Serovars and antibiotic sensitivity of Salmonella spp. isolated from non-diarrhoeic cats in Trinidad. Vet Arhiv 2005; 75: 223-31.
21. Khan AQ. Salmonella infections in dogs and cats in the Sudan. British Veterinary Journal. 1970; 126: 607-11.
22. Spain CV, Scarlett JM, Carlett SE, Wade P. Prevalence of enteric zoonotic agents in cats less than a year old in central New York State. Journal of Veterinary Internal Medicine 2001; 15: 33-8.
23. Zendad MM, AL-Obaidi QT, AL-Talibi MAM. Prevalence of Salmonella species In stray cats in Mosul City, IRAQ. Online Journal of Animal and Feed Research. 2014; 4: 133-36.
24. Hill SL, Cheney JM, Taton GF, Reif JS, Bruns C. Prevalence of enteric zoonotic organisms in cats. Journal of American Veterinary Medicine Association. 2000; 216: 687-92.
25. Bhaiyat MI, Hariharan H, Chikweto A, Brathwaite-Sylvester E, Burnett PJ A. Concurrent lymphosarcoma and Salmonella enteritidis infection in a cat: a case report. Veterinary Medicine. 2009;: 451–54.
26. Weber A, Wachowitz R, Weigl U, Schafer-Schmidt R. Occurrence of Salmonella in fecal samples of dogs and cats in Northern Bavaria from 1975 to 1994. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 1995; 108: 401-5.
27. Philbey AW, Mather HA, Taylor DJ, Coia JE. Isolation of avian strains of Salmonella enterica serovar Typhimurium from cats with enteric disease in the United Kingdom. Veterinary Record. 2008; 162: 120–22.
28. Stiver LS, Frazier KS, Mauel MJ, Styer EL. Septicemic Salmonellosis in two cats fed a raw-meat diet. Journal of the American Animal Hospital Association. 2003; 39: 538-42.
29. Sanchez S, Hofacre CL, Lee MD, Maurer JJ, Doyle MP. Animal sources of salmonellosis in humans. Journal of American Veterinary Medicine Association. 2002; 221: 492-7.
30. Tauni MA, Osterlund A. Outbreak of Salmonella typhimurium in cats and humans associated with infection in wild birds. Journal of Small Animal Practice. 2000; 41: 339-41.
31. Philbey AW, Brown FM, Mather HA, Coia JE. Salmonellosis in cats in the United Kingdom: 1955 to 2007. Veterinary Record. 2009; 164: 120-22.
32. Immerseel FV, Pasmans F, Buck JD, Rychlik I, Hradecka H, Collard JM, et al. Cats as a Risk for Transmission of Antimicrobial Drug–resistant Salmonella. Emerging Infectious Diseases. 2004; 10: 2169.
33. Water R. Antimicrobial resistance in zoonotic bacteria isolated from animals in different countries. British Society for Antimicrobial Chemotherapy Press. 2005; 68: 955-65.
34. Amini K, Zahraei salehi T, Nikbakht Gh, Ranjbar R, Amini J, Ashrafgan Sh. Molecular detection of invA and spv virulences genes in salmonella enteritidis isolated from humans and animals in Iran. African Journal of Microbiology 2010; 4: 2202-10.
35. Normand EH, Gibson NR, be SWJ, Carmicheal S, Taylor DJ. Antimicrobial-resistance trends in bacterial isolates from companion-animal community practice in the UK. Preventive Veterinary Medicine. 2000; 46: 267-78.
36. Davies M, Stewart AD. Transferable drug resistance in man and animals: genetic relationship between R-plasmids in enteric bacteria from man and domestic pets. Australian Veterinary Journal. 1978; 54: 507-12.

www.SID.ir

Archive of SID

Iranian Journal of Epidemiology 2016; 12(3): 47-55.
Original Article

Epidemiological Survey of Salmonella in Rural Cats: A Survey of Serotype, Presence of spv R and spv B Genes, and Antibiotic Resistance Pattern

Namroodi S[1], Staji H[2], Mazandarani R[3]

1- Assistant Professor, Department of Environmental Sciences, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran
3- Employee of Golestan Province Veterinary Office, Kordkooy Branch, Kordkooy, Iran
Corresponding author: Namroodi S, snamroodi2000@yahoo.com

Background and Objectives: Salmonella spp. are one of the most important zoonotic agents with a worldwide distribution. Asymptomatic cats which may excrete *Salmonella. spp* for weeks can play important role in environmental contamination. The aim of this study was to access the role of rural cats in dissemination of *Salmonella. spp* .

Methods: Salmonella excretion was evaluated in 170 samples (rectal swabs) of apparently healthy rural cats from Golestan and Mazandaran provinces using PCR and conventional microbial culture tests. After serotyping, the presence of spv R and spv B genes and the antibiotic resistance pattern of isolated Salmoella spp. were surveyed.

Results: Out of 170 samples, 25 (14.7%) cases with *Salmonella spp.*, including: 13 (52%) cases of *S enteritidis*, 7(28%) cases of *S Dublin*, and 5 (20%) cases of *S typhymurium* were recovered.
The presence of spv R and spv B genes was detected in 5 out of 25 isolated *Salmonella spp*. The highest resistance of isolated Salmonella spp. was to Streptomycin, Lincospectin, and Tetracycline. The rate of Salmonella isolation was similar in male and female rural cats and also Golestan and Mazandaran provinces.

Conclusion: Detection of zoonotic serotypes of *Salmonella spp* with spv R and spv B genes and multidrug antibiotic resistance in apparently healthy rural cats make them a potential significant threat to public health. Similar studies on different populations of cats must be taken in consideration when prevention, control or eradication programs of salmonellosis are going to be carried out.

Keywords: Rural cat, Salmonella, Antibiotic resistance, spv R and spv B genes

www.SID.ir