نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران؛ ۱۴۰۳؛ ۱۸(۱): ۵۱-۵۹.
http://doi.org/10.22034/IJVCS.2024.14571.1068

میزان آلودگی مرغداری‌های صنعتی شمال‌غرب ایران به *سالمونلا* گالیناروم و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی برخی ژن‌های حدت

مسعود خاک زادیه[1*]، عبدالکریم زمانی مقدم[2]، محمدرضا محزونیه[3]

۱. دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲.گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۳.گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

دریافت: ۱۵ آبان‌ماه ۱۴۰۲ **پذیرش:** ۸ اسفندماه ۱۴۰۲

چکیده

بیماری گالیناروم با عامل *سالمونلا* گالیناروم از جمله بیماری‌های چالش برانگیز در صنعت طیور است. در این مطالعه میزان آلودگی گله‌های مرغ صنعتی شمال‌غرب ایران به *سالمونلا* گالیناروم، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی برخی ژن‌های حدت (msgA, spiA, pagC) تحت بررسی و ارزیابی قرار گرفت. کلیه نمونه برداری‌ها در گله ها با علایم بالینی مشکوک به سالمونلوزیس از کلینیک‌های استان آذربایجان‌شرقی، آذربایجان‌غربی، اردبیل و زنجان با روش‌های کشت میکروبی، آنالیز شیمیایی، PCR و سرولوژیکی تحت بررسی و تایید جداسازی قرار گرفت. بعد از تایید تشخیص درگیری با *سالمونلا* گالیناروم به روش دیسک‌گذاری مقاومت آنتی‌بیوتکی ارزیابی گشته و فراوانی ژن‌های حدت در هر جدایه بررسی گردید. از ۲۵ جدایه *سالمونلا* گالیناروم در این مطالعه بیشترین مقاومت میکروبی مربوط به تتراسایکلین(۷۶٪)، اکسی‌تتراسایکلین(۷۲٪) و بیشترین حساسیت مربوط به آمیکاسین (۸۰٪) و فوزبک (۷۲٪) گزارش گردید(p<۰/۰۵). به میزان ۱۰۰٪ از جدایه‌ها حداقل به ۶ نوع آنتی بیوتیک مقاومت داشته‌اند (p<۰/۰۵). در بررسی جدایه‌ها ۸٪ واجد ژن msgA، ۲۸٪ واجد ژن spiA و ۸٪ واجد ژن pagC بودند که از این جدایه‌ها، دو جدایه واجد هر سه ژن حدت بودند.

واژه‌های کلیدی: *سالمونلا* گالیناروم، ژن حدت، شمال‌غرب ایران، مقاومت آنتی بیوتیکی، مرغ صنعتی

مقدمه

باکتری *سالمونلا* گالیناروم به شکل باسیلی کوتاه، فاقد تاژک و به تبع آن فاقد توانایی حرکت است. این باکتری‌ها قادر به تخمیر قند گلوکز، قند مانیتول، قند مالتوز و قند دولسیتول هستند اما قند لاکتوز، قند سوکروز و قند سالیسین را تخمیر نمی‌کنند. عامل بیماری گالیناروم (تیفوئید) در مدفوع پرندگان مبتلا شده حضور دارد و مصرف غذا و آب آلوده به مدفوع این پرندگان توسط سایر پرندگان راه اصلی و عمده در انتقال افقی بیماری تیفوئید بیان شده است. مطالعات مختلف نشان داده است که باکتری سالمونلا گالیناروم حداقل به مدت یک ماه در مدفوع و فضولات توانایی بقا دارند. مدت زمان بقای این باکتری در لاشه پرندگان آلوده بیشتر از مدفوع است. جانورانی مثل موش، سگ، روباه و یا پرندگان وحشی و مهاجر ممکن است با حمل لاشه‌های آلوده پرندگان از یک گله به گله‌ی دیگر یا از یک فارم به فارم دیگر باعث گسترش آلودگی سالمونلا گالیناروم شوند. پرندگان بهبود یافته از بیماری تیفوئید اغلب به حاملین دراز مدت این باکتری تبدیل می‌شوند؛ بنابراین مسلم است که نگهداری و یا جابه‌جایی این پرندگان حامل، باعث انتشار بیماری تیفوئید ناشی از سالمونلا گالیناروم خواهد گردید. انتقال از راه تخم پرندگان نیز ممکن است اتفاق بیفتد و جوجه‌های حاصل از مادران آلوده در کارخانجات جوجه‌کشی و یا در سالن پرورش به عنوان منبع آلوده کننده سایر جوجه‌ها به شمار می‌روند. افرادی که به نوعی با پرندگان پرورشی در مرغداری‌ها یا سایر مراکز نگهداری پرندگان در ارتباط

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: masood.khakzadihe@gmail.com

هستند نیز می‌توانند در صورتی که توجه کافی به ضد عفونی واصول امنیت زیستی نکنند در انتقال این بیماری از یک سالن به سالن دیگر و یا از یک فارم به فارم دیگر و یا از منطقه‌ای به منطقه دیگر نقش داشته باشند. نگهداری از پرندگان به‌صورت بومی در روستاها و مراکز غیر صنعتی و انتقال از این دسته پرندگان به مرغداری‌ها و سایر مراکز پرورشی نیز از جمله راه‌های اساسی و عمده در انتقال سالمونلا گالیناروم به شمار می‌آید. (۲،۴،۲۱،۲۸)

مطالعات نشان داده است که سلول‌های فاگوسیت نقش عمده و اساسی در بحث توسعه و گسترش بیماری سیستمیک در پرندگان دارند و سالمونلا گالیناروم با استفاده از این خاصیت خود می‌تواند در قسمت‌های مختلف بدن میزبان خود نقش ایفا کند. عفونت سیستمیک با بقا در داخل سلول‌های فاگوسیتی، نشانه‌ای از سروارهای اختصاصی میزبان است. عفونت ناشی از سالمونلا گالیناروم پس از گذراندن مانع اپیتلیال روده، توسط سلول های فاگوسیتی میزبان، از جمله سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژها به بدن میزبان خود نفوذ می‌کنند(۲۱). حضور ژن‌های کنترل کننده نفوذ به فاگوسیت‌ها به عنوان عوامل حدت در این باکتری مطرح است و شناسایی آن در بحث نظارت و کنترل نقش مهمی را ایفا می‌کند (۳،۹،۱۳).

درمان و مصرف دارو باعث حذف کامل عفونت ناشی از *سالمونلا* گالیناروم درگله‌های طیور نمی‌شود و پرندگان بعد از درمان تا مدت‌ها حامل باقی می‌مانند، بنابراین ممکن است پرندگان حساس در گله مادر دوباره پس از مدتی بیمار شوند و علایم بالینی بیماری را از خود بروز دهند. استفاده طولانی مدت و گسترده از آنتی بیوتیک‌ها در بعضی از کشورها و ازجمله ایران منجر به بروز پدیده‌ی مقاومت آنتی بیوتیکی شده است. امروزه مقاومت میکروبی به یکی از مهمترین و اساسی‌ترین چالش‌های پیش روی سازمان‌های متولی سلامت در سطح جهان تبدیل گردیده است. ظهور و بروز مکانیسم‌های جدید مقاومت میکروبی و گسترش جهانی آن، توانایی انسان در درمان بیماری‌های عفونی معمول را به شدت تهدید نموده است. مقاومت میکروبی منجر به کاهش اثربخشی مواد ضدمیکروبی، افزایش خطر گسترش میکروارگانیسم‌های مقاوم، افزایش هزینه‌های مراقبت‌های بهداشتی، افزایش طول مدت درمان و بستری، کاهش توانایی کنترل همه‌گیری بیماری‌های عفونی و به دنبال آن افزایش واگیری و مرگ و میر بیماری‌های قابل درمان گردیده است (۲۱). هدف از مطالعه حاضر بررسی میزان آلودگی گله‌های شمال‌غرب ایران به باکتری *سالمونلا* گالیناروم و مقاومت میکروبی بر علیه آنتی‌بیوتیک‌ها و بررسی برخی ژن‌های حدت ماکروفاژی موثر در بیماری‌زایی می‌باشد.

مواد و روش کار

جهت اجرای مطالعه حاضر در یک بازه زمانی حدود پنج ساله در ماه‌های مختلف سال ۱۳۹۷ تا ۱۴۰۱ هجری شمسی از گله مرغ‌های تخم‌گذار و مادر ارجاعی از مزارع مختلف به کلینیک‌های تخصصی طیور و مرغداری‌های استان‌های آذربایجان‌شرقی، آذربایجان‌غربی، اردبیل و زنجان نمونه‌برداری شده است. بدین منظور ۱۹۶ گله مختلف مرغ تخم‌گذار و یا مادر بررسی گردیدند. در ابتدا جهت آزمایش آگلوتیناسیون، قطره خون اخذ شده از ورید بالی با پادگن باکتری (شرکت بیووک) مخلوط گردید. در آزمایشات مثبت با مخلوط کردن خون و پادگن، واکنش آگلوتیناسیون به سرعت اتفاق افتاد و در عرض سی ثانیه کامل شد. اگر گرانول‌های آبی رنگ سرسنجاقی در کل مخلوط و یا در حاشیه‌های آن دیده می‌شد، نتیجه آزمون مشکوک قلمداد می‌گردید و اگر واکنش بعد از دو دقیقه ایجاد می‌گردید نتیجه آزمایش منفی بود. نمونه‌های مشکوک جهت بررسی بیشتر به آزمایشگاه منتقل گردید. در گله نمونه‌برداری جهت آزمایش آگلوتیناسیون حداقل از ۵۰ قطعه از پرندگان به ازای هر ۵۰۰۰ قطعه به‌صورت تصادفی صورت می‌گرفت. برای جداسازی باکتری، در گله‌هایی که آزمون آگلوتیناسیون آن‌ها مثبت بود، نمونه‌برداری از لاشه تلف شده (مرگ طبیعی یا کشتار شده نمونه مثبت آگلوتیناسیون با ذبح) در شرایط استریل از کبد، طحال، تخمدان و سکوم صورت گرفت. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه در محیط‌های کشت غنی‌کننده انتخابی سالمونلا (تتراتیونات یا سلنیت F) کشت شده و پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد از این محیط به محیط انتخابی (سالمونلا شیگلا آگار) منتقل شده و به مدت ۲۴ الی-۴۸ ساعت در

دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شده‌اند. پرگنه‌ها لاکتوز منفی و H2S مثبت مظنون به سالمونلا جدا و خالص‌سازی شده و در محیط‌های افتراقی (TSI agar و لیزین آیرون آگار LIA agar، SIM، سیمون سیترات و ONPG) تعیین هویت شده‌اند. جهت تایید تشخیص از آزمایش آگلوتیناسیون با آنتی‌سرم پلی‌والان (شرکت پادتن طب) نیز بهره‌گیری شد. تمامی جدایه‌ها در صورت تایید با PCR (پرایمرهای اختصاصی جنس سالمونلا و سروتیپ گالینارم) شرکت Geneall کشور کره وارد مرحله بعدی مطالعه شدند.

برای انجام آنتی‌بیوگرام و تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی از روش دیسک گذاری با آزمایش انتشار از دیسک به روش کربی-بوئر بر اساس اصول Clinical and Laboratory Standards Institute انجام گرفت. جهت انجام آزمون آنتی‌بیوگرام از دیسک‌های آنتی بیوتیک: انروفلوکساسین، تتراسایکلین، کلستین، نئومایسین، جنتامایسین، آمیکاسین، آمپی‌سیلین، فلورفنیکل، داکسی سایکلین، فوزبک، سولفادیمتوکسین+ تریمتوپریم، اکسی تتراسایکلین، سفتریاکسون، سفازولین شرکت پادتن طب استفاده شد. جدایه‌ها بر اساس قطر هاله عدم رشد و استاندارد شرکت تولید کننده دیسک به سه دسته حساس، نیمه حساس و مقاوم دسته‌بندی گردیدند.

جهت بررسی حضور یا عدم حضور ژن‌های حدت در جدایه‌های سالمونلا گالیناروم با استفاده از پرایمرهای موجود در جدول شماره ۲ آنالیز انجام گردید. برای طراحی پرایمر از نرم افزار Oligo ورژن ۷ استفاده شد. جهت استخراج ژن برای بررسی جدایه و ژن‌های حدت از روش بویلینگ استفاده گردید. روش آماری جهت ارایه نتایج در این مطالعه بصورت بیان فراوانی و درصد فراوانی بازه ۰ تا ۱۰۰ می باشد جهت آنالیز داده ها از نرم افزار SPSS ورژن ۲۲ استفاده گردید.

جدول ۱- پرایمرهای ژن های حدت *سالمونلا* گالیناروم و باکتری *سالمونلا* گالیناروم جدا شده

ردیف	نام ژن	پرایمر	وزن محصول (bp)
۱	S.gall sgp F	F: GGATGTCCACGCTCATCATTTCTC R:TGAAAGCTGGCGTTACGGTTA	۴۴۰
۲	msgA	F: GCCAGGCGCACGCGAAATCATCC R: GCGACCAGCCACATATCAGCCTCTTCAAAC	۱۸۹
۳	pagC	F: CGCCTTTTCCGTGGGGTATGC R: GAAGCCGTTTATTTTTGTAGAGGAGATGTT	۴۵۴
۴	spiA	F: CCAGGGGTCGTTAGTGTATTGCGTGAGATG R: CGCGTAACAAAGAACCCGTAGTGATGGATT	۵۵۰

نتایج

از ۱۹۶ گله بررسی شده در این مطالعه از ۲۵ گله جداسازی *سالمونلا* گالیناروم انجام گردید (۲۴٪ از گله ها آلوده به *سالمونلا* گالیناروم بودند). از ۲۵ جدایه *سالمونلا* گالیناروم در این مطالعه بیشترین مقاومت میکروبی مربوط به تتراسایکلین(۷۶٪)، اکسی تتراسایکلین(۷۲٪) و بیشترین حساسیت مربوط به آمیکاسین (۸۰٪) و فوزبک (۷۲٪) گزارش گردید. در جدول شماره ۲ نتایج به صورت فراوانی و درصد بیان گردیده و جدول شماره ۳ مقاومت چندگانه به ۱۴ نوع آنتی بیوتیک در جدایه ها را به نمایش گذاشته است.

جدول ۲- توزیع فراوانی *سالمونلا* گالیناروم های جدا شده نسبت به چهار استان بررسی شده

استان	فراوانی نمونه اخذ شده	فراوانی جدایه	درصد جداسازی نمونه
آذربایجان شرقی	۵۰	۵	۱۰
آذربایجان غربی	۴۸	۶	۱۲
اردبیل	۵۵	۵	۹
زنجان	۴۳	۹	۲۱

براساس نتایج جدول توزیع فراوانی *سالمونلا* گالیناروم های جدا شده نسبت به چهار استان بررسی شده بیشترین درصد جداسازی *سالمونلا* گالیناروم مربوط به استان زنجان و کمترین میزان مربوط به استان اردبیل است، با این وجود تفاوت معنی‌داری در میزان آلودگی بین استان‌های مختلف ثبت نگردید ($p<۰/۰۵$).

جدول ۳- توزیع فراوانی حساسیت *سالمونلا* گالیناروم های جدا شده نسبت به ۱۴ نوع آنتی بیوتیک بررسی شده

آنتی بیوتیک (علامت اختصاری و غلظت میلی گرم)	مقاوم (R)		حساسیت سالمونلا: حساس متوسط (SS)		حساس (S)	
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
انروفلوکساسین (NFX 30)	۱۱	۴۴	۷	۲۸	۷	۲۸
اکسی تتراسایکلین (OTC 30)	۱۸	۷۲	۵	۲۰	۲	۸
سفترياکسون (CRO 30)	۱۰	۴۰	۱۲	۴۸	۳	۱۲
سفازولین (CZ 30)	۱۰	۴۰	۱۱	۴۴	۴	۱۶
تتراسایکلین (TE 30)	۱۹	۷۶	۴	۱۶	۲	۸
کلستین (CL 30)	۱۲	۴۸	۱۰	۴۰	۳	۱۲
نئومایسین (N 30)	۱۲	۴۸	۸	۳۲	۵	۲۰
جنتامایسین (GM 10)	۱۰	۴۰	۱۲	۴۸	۳	۱۲
آمیکاسین (AM 10)	۲	۸	۳	۱۲	۲۰	۸۰
آمپی سیلین (AM 10)	۱۰	۴۰	۷	۲۸	۸	۳۲
فلورفنیکل (FF 30)	۱۳	۵۲	۱۰	۴۰	۲	۸
داکسی سایکلین (DOX 30)	۱۵	۶۰	۶	۲۴	۴	۱۶
فوزبک (FOS 30)	۲	۸	۵	۲۰	۱۸	۷۲
سولفادی متوکسین + تریمتوپریم (TS 23/75)	۵	۲۰	۱۵	۶۰	۵	۲۰

جدول ۴- مقاومت چندگانه ۲۵ جدایه سالمونلا در طیور به ۱۴ نوع آنتی بیوتیک بر اساس تعداد و درصد کل جدایه‌ها

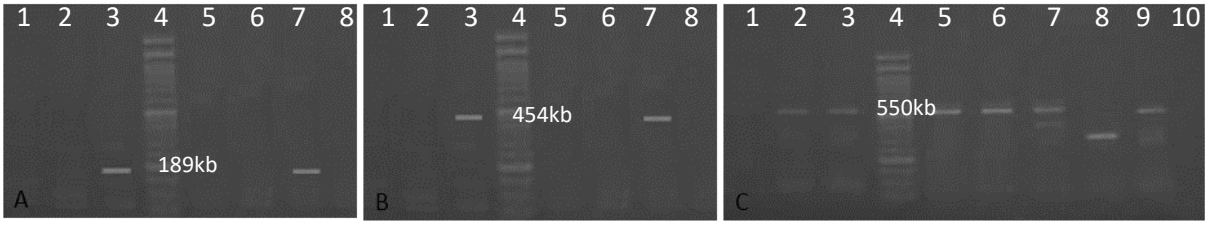
تعداد آنتی بیوتیک	درصد
۱	۱۰۰
۲	۱۰۰
۳	۱۰۰
۴	۱۰۰
۵	۱۰۰
۶	۱۰۰
۷	۸۵
۸	۲۵
۹	۱۰
۱۰	۰

بر اساس جدول شماره ۳ به میزان ۱۰۰٪ از جدایه‌ها حداقل به ۶ نوع آنتی بیوتیک مقاومت داشته اند و هیچ‌کدام از جدایه‌ها به بیش از ۱۰ نوع دیسک آنتی‌بیوتیکی مقاومت نشان ندادند و همه جدایه‌ها واجد حساسیت متوسط یا حساسیت نسبی حداقلی به ۴ آنتی بیوتیک هستند.

جدول ۵- توزیع فراوانی ژن‌های حدت *سالمونلا گالیناروم* های جدا شده به تفکیک ژن

نام ژن	فراوانی نمونه اخذ شده	فراوانی نمونه مثبت	درصد نمونه مثبت به اخذ شده	وزن ژن (kbp)
msgA	۲۵	۲	۸	۱۸۹
pagC	۲۵	۲	۸	۴۵۴
spiA	۲۵	۷	۲۸	۵۵۰

در بررسی جدایه‌های سالمونلا گالیناروم از بین جدایه های آزمایش شده از دو جدایه جداسازی ژن msgA (۸٪)، دو جدایه جداسازی ژن pagC (۸٪) و هفت جدایه جداسازی ژن spiA (۲۸٪) صورت گرفت که دو جدایه از جدایه‌ها واجد هر ۳ ژن حدت بودند. تصاویر ژل الکتروفورز ژن‌های حدت در شکل ۱ درج گردیده اند. در بررسی‌های انجام شده تمامی گروه ها واجد گروه کنترل مثبت و واجد گروه کنترل منفی بودند که در گروه منفی باند روی ژل مشاهده نگردید.



شکل ۱- تصاویر ژل الکتروفورز ژن های حدت با لدر ۵۰ bp : A: باندهای تشکیل شده ژن msgA با وزن ۱۸۹ kb ، ۲ جدایه جداسازی ژن msgA (۸٪). B: باندهای تشکیل شده ژن pagC با وزن ۴۵۴ kbp، ۲ جدایه جداسازی ژن pagC (۸٪). C: باندهای تشکیل شده ژن spiA با وزن ۵۵۰ kbp، ۷ جدایه جداسازی ژن spiA (۲۸٪). در تمامی نمونه‌ها ستون ۱ نمونه کنترل منفی، شماره ۴ لدر و شماره ۳ نمونه کنترل مثبت می‌باشد.

بحث

صنعت طیور در ایران از جمله مهم‌ترین و کلیدی‌ترین صنایع تولیدی به حساب می‌آید و به صورت مستقیم با غذا و سلامت مردم در ارتباط است. بیماری تیفوئید با عامل باکتری سالمونلا گالیناروم از جمله عوامل موثر و چالش برانگیز در بحث کنترل بیماری و سلامت طیور پرورشی در کشور مطرح است. تا چندی پیش سالمونلا گالیناروم تنها در بین پرندگان مطرح بود اما با مشاهده برخی گزارشات سپتی‌سمی و ابتلای انسان‌ها به این عامل، سازمان جهانی بهداشت اخطارهایی در بحث آلودگی جوامع بشری نیز مطرح نموده است (۲۶).

در مطالعه Zhou و همکاران در سال ۲۰۲۲، یک مرور سیستماتیک و متاآنالیز از شیوع جهانی سالمونلا گالیناروم طی سال‌های ۱۹۴۵-۲۰۲۱ ارائه گردیده است. در مجموع، ۲۰۱ مطالعه برای تجزیه و تحلیل کیفی (بیش از ۹۰۰ میلیون نمونه) شناسایی شد. متاآنالیز تحت بیش از ۱۸۳ مطالعه غربال شده قرار گرفت. نتایج نشان داد که همه قاره‌ها به جز اقیانوسیه، شیوع مثبت سالمونلا گالیناروم را مشاهده کردند. در حالی که آسیا با ۱۷/۳۱

درصد و اروپا با ۱۶/۳ درصد بیشترین شیوع را داشتند. علاوه بر این، شیوع سالمونلا گالیناروم مشاهده شده در ۱۷ کشور تحت تجزیه و تحلیل قرار گرفت که گزارش کردند که به ترتیب در بنگلادش (۲۵/۷۵٪)، بریتانیا (۲۴٪/۰۳) و آرژانتین (۲۰/۶۹٪) بالا بود. در این مطالعه ایران جزو کشورهای آسیایی طبقه بندی گردیده و جزو کشورهای با میزان بالای شیوع در نظر گرفته شده است (۳۰). در مقایسه یافته‌های این مقاله با نتایج Zhou و همکاران نتایج نشانگر آلودگی ۲۴ درصدی است که از میانگین کشورهای آسیایی بالاتر است. در مقایسه با کشورهای تحت مطالعه میزان آلودگی در شمال‌غرب ایران هم تراز با کشور بریتانیا است. بر اساس یافته‌های این مقاله می توان نتیجه گرفت شیوع سالمونلا گالیناروم در شمال‌غرب ایران جزو بالاترین مناطق شیوع در جهان است. در یک مطالعه، میزان بالایی از آلودگی در تخم مرغ ها به سالمونلا را ثبت نموده اند تا جایی که ۶/۸۹٪ از تخم مرغ ها آلودگی به سالمونلا را نشان داده است و بیشترین جدایه ها مربوط به سالمونلا انتریدیس، سالمونلا گالیناروم، سالمونلا ویرچو و سالمونلا نیوپورت بوده و شهرهای مشهد و زنجان به عنوان مناطقی که بیشترین میزان آلودگی را داشته اند مطرح است. (۸). بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه استان زنجان با بیشترین میزان جداسازی رکورد دار شیوع در بین ۴ استان بررسی شده است، ولی در بررسی آماری این اختلاف با سایر استان‌ها معنی دار نبود. نتایج به دست آمده و مقایسه آن با نتایج بدست آمده در مطالعه حسینی نژاد و همکاران نشانگر شیوع بالای سالمونلا گالیناروم در شهر زنجان است. در مطالعه مشابهی که توسط مهدوی و همکاران در سال ۱۴۰۰ هجری شمسی بر روی طیور تخم‌گذار شمال‌غرب کشور انجام گردید در ۳۰ درصد از گله‌ها سالمونلا گالیناروم، در ۵ درصد سالمونلا اینتریتیدیس و در ۵ درصد از آن‌ها هم همزمان سالمونلا اینتریتیدیس و سالمونلا گالیناروم جدا شد. بیشترین میزان حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های سالمونلا هم نسبت به فسفومایسین و دانوفلوکساسین با فراوانی ۱۰۰ درصد و نسبت به سولتریم با فراوانی ۷۸/۶ درصد ثبت شد. بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیز نسبت به اریترومایسین با فراوانی ۷۵ درصد و کلرتتراسایکلین با فراوانی ۵۳/۶ درصد مشاهده شد. نتایج مهدوی و همکاران مشابهت بالایی با نتایج بدست آمده توسط مطالعه ما دارد (۱۸). مطالعات آنتی‌بیوگرام توسط Parvej و همکاران (۲۰) نشان داد که سالمونلا پولوروم و سالمونلا گالیناروم جدا شده توسط آن‌ها کم و بیش حساس به کلرامفنیکل، آزیترومایسین، سیپروفلوکساکسین، جنتامایسین و انورفلوکساسین بوده اند. کانگ و همکاران (۱۲) گزارش داد که ضدمیکروب‌هایی از جمله آمینوگلیکوزیدها و فلوروکینولون ها معمولاً در مزارع مرغ تجاری برای پیشگیری یا درمان تیفوئید ماکیان در کره جنوبی استفاده می‌شوند. آن‌ها نشان دادند که مقاومت به فلوروکینولون به موازات مقاومت آمینوگلیکوزیدهای متعدد رخ می‌دهد. اخیراً برخی از نویسندگان افزایش مقاومت به کینولون در سالمونلا را گزارش کرده‌اند (۱۱،۱۴،۱۶،۱۹،۲۵،۲۷) که تا حدی نیز از یافته‌های این مطالعه حمایت می‌کند. از ۲۵ جدایه سالمونلا گالیناروم در مطالعه ما بیشترین مقاومت میکروبی مربوط به تتراسایکلین(۷۶٪)، اکسی تتراسایکلین(۷۲٪) و بیشترین حساسیت مربوط به آمیکاسین (۸۰٪) و فوزبک (۷۲٪) گزارش گردید .

سروارهای سالمونلا انتریکا سازگار با میزبان، ژن‌های حدت را با افزایش شبه ژن زایی کاهش می‌دهند، که به حذف برخی مسیرهای متابولیکی برای کلونیزاسیون روده‌ای باکتری‌ها مربوط می‌شود (۲۳). سالمونلا گالیناروم دارای دامنه محدودی از میزبان‌ها است که عمدتاً به طیور محدود می‌شود و در مقایسه با سایر سروارهای *سالمونلا* انتریکا، ژن‌های حدت تخریب شده و کاذب بیشتری را نشان می‌دهد (۱۵،۲۳). علاوه بر این، این باکتری‌ها تفاوت‌های بیوشیمیایی کمی در بین سویه‌ها دارند (۵)، و جدایه‌های مزرعه‌ای سطوح بالایی از شباهت ژنتیکی را نشان می‌دهند. علی‌رغم از بین رفتن ژن‌های حدت، افزایش شبه ژن‌ها و ویژگی‌های همگن سالمونلا گالیناروم، و تلاش برای ریشه‌کنی (به عنوان مثال، واکسیناسیون و درمان‌های ضد میکروبی) ، این بیماری هنوز در بین گله‌های تجاری رایج است. در مطالعه Kim و همکاران در سال ۲۰۲۰ بر روی سالمونلا گالیناروم در کشور کره تمامی جدایه‌ها طی سال های ۲۰۱۴ تا ۲۰۱۸ واجد هر سه ژن msgA, spiA, pagC بودند. در مطالعه‌ای که توسط ما صورت گرفت دو جدایه از جدایه‌ها واجد هر ۳

ژن حدت بودند. یافته کیم و همکاران در مقایسه با یافته‌های ما تاییدی بر توانایی حضور این ژن در سالمونلا گالیناروم است(۱۳). سه ژن مذکور به عنوان ژن‌های موثر در زنده مانی داخل سلولی ماکروفاژهای میزبان مطرح می‌باشند و توانایی باکتری را در مقاومت در برابر خورده شدن ماکروفاژی توسط میزبان را افزایش می‌دهند (۱۳). این ژن‌ها گرچه ممکن است به صورت شبه‌ژن در سالمونلا گالیناروم حضور داشته باشند و عملکرد بیوشیمیایی از خود نشان ندهند اما حضورشان در سالمونلا گالیناروم در جدایه‌های مختلف می تواند بیانگر تنوع سالمونلا گالیناروم، توانایی نسبی و در شرایط جهش ژنی فعالیت‌های خارج از انتظار سالمونلا گالیناروم همچون درگیری‌های جوامع انسانی باشد. وجود پلاسمیدهای حدت در سرووارهای سازگار با میزبان نشان می‌دهد که اکتساب این پلاسمیدهای حدت ممکن است دامنه میزبان سالمونلا را گسترش دهد (۲۴). ژن spi یا ژن جزایر پاتوژنیسیته سالمونلا (Salmonella pathogenicity island)جزو ژن‌های با ویژگی انتقال جانبی است. عمده ترین وظایفی که برای ژن SPI-1 در ساختار حدت باکتری مشخص گردیده است تهاجم به سلول‌های میزبان غیرفاگوسیتیک، آپوپتوز ماکروفاژ در شرایط آزمایشگاهی و یک عملکرد با واسطه‌ی پروتئین‌های SipA وSptP ، که توسط سازوکار ترشحی Inv/Spa نیز ترشح می‌شوند، اما برای تهاجم غیرقابل استفاده هستند(۷). به نظر می‌رسد SPI-1تأثیر کمی بر حدت و بقای سرووار سالمونلا گالیناروم در میزبان داشته باشد (۱۰،۲۹). در یک مطالعه فقدان spiA هیچ تاثیری بر چسبندگی و تهاجم به سلول‌های اپیتلیال نداشت، جهش دلتاspiA کاهش چسبندگی و تهاجم سالمونلا انتریتیدیس را در مدل موش نشان داد (۶). ژن pagC به طور گسترده در بین سالمونلاها توزیع شده است، اما اطلاعات محدودی در عملکرد آن وجود دارد. در مطالعه‌ای نقص ژن pagC منجر به افزایش کلونیزاسیون باکتری سالمونلا پلوروم در روده (به ویژه در سکوم) و افزایش تشکیل بیوفیلم شد، در حالی که تعداد وزیکول‌های غشای خارجی در کشت باکتری کاهش یافت. وزیکول‌های غشای خارجی خالص شده قادر به کاهش تشکیل بیوفیلم سالمونلا پلوروم در شرایط آزمایشگاهی بودند. علاوه بر این، نتایج یک تجزیه و تحلیل طیف سنجی جرمی، وزیکول‌های غشای خارجی خالص شده نشان داد که برخی از آنزیم های ذخیره شده توسط وزیکول‌های غشای خارجی ممکن است در تخریب بیوفیلم دخیل باشند. در این مطالعه بیان گردید که ژن pagCدر تنظیم رشد باکتری یا سازگاری pH محیطی شرکت نمی کند (۱۷). در مطالعه ای تاثیرات صفرا بر بیان ژن pagC در سالمونلا تیفی موریوم ارزیابی گردید . PagCتنظیم شده با PhoP-PhoQ در حضور صفرا کاهش می یابد و مشخص شد که صفرا یک سیگنال محیطی مهم است که توسط گونه‌های سالمونلا حس می‌شود. و اینکه صفرا در تنظیم بیان ژن باکتریایی در مسیرهای متعدد مرتبط با حدت نقش دارد (۲۲). مشخص گردیده است که پروتئین PagC در بیماری سیستمیک نقش دارد و از چهار ژن اضافی که در ناحیه حاوی pagC حضور دارند، فقط msgA برای بقای داخل ماکروفاژ و حدت نیاز است. علیرغم شباهت در فنوتیپ‌های حدت، ژن‌های pagC و msgA در تنظیم و توزیع فیلوژنتیکی متفاوت هستند و بیانpagC ، بر خلاف ژنmsgA ، به پروتئین تنظیم‌کننده PhoP وابسته است (۷). در یک مطالعه در ایران شیوع ژن pagC در جدایه‌های سالمونلا انتریتیدیس از نمونه های طیور به طور قابل توجهی بیشتر از جدایه سالمونلا انتریتیدیس از نمونه های تخم مرغ بود از بین هشت ژن حدت تحت مطالعه، ژن‌های invA و msgAکه در تمام جدایه‌های سالمونلا انتریتیدیس شناسایی شدند، بیشترین شیوع را داشتند (۱). نتایج مطالعه نشانگر میزان بالای درگیری گله‌های شمال‌غرب ایران به سالمونلا گالیناروم و مقاومت میکروبی بر علیه آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. حضور ژن‌های حدت در برخی نمونه‌های اخذ شده نشانگر احتمال گسترش بیشتر بیماری در گله‌ها با حدت بیماری بالاتر می‌باشد که نیازمند تدابیر امنیت زیستی بیشتر و کنترل بیماری در کشور است.

قدردانی و تشکر

بدین وسیله از همکاری معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد، آزمایشگاه تخصصی دامپزشکی صدرا و دکتر

حسین نیک پیران که در اجرای این تحقیق یاری گر بوده اند تقدیر و تشکر می گردد.

منابع

1. Bahramianfard H, Derakhshandeh A, Naziri Z, Khaltabadi Farahani R. Prevalence, virulence factor and antimicrobial resistance analysis of Salmonella Enteritidis from poultry and egg samples in Iran. BMC veterinary research. 2021;17(1):196.
2. Barrow PA, Jones MA, Smith AL, Wigley P. The long view: Salmonella–the last forty years. Avian Pathology. 2012;41(5):413-20.
3. Chadfield MS, Brown DJ, Aabo S, Christensen JP, Olsen JE. Comparison of intestinal invasion and macrophage response of Salmonella Gallinarum and other host-adapted Salmonella enterica serovars in the avian host. Veterinary Microbiology. 2003;92(1-2):49-64.
4. Cosby DE, Cox NA, Harrison MA, Wilson JL, Buhr RJ, Fedorka-Cray PJ. Salmonella and antimicrobial resistance in broilers: A review. Journal of Applied Poultry Research. 2015;24(3):408-26.
5. Crichton PB, Old DC. Salmonellae of serotypes Gallinarum and Pullorum grouped by biotyping and fimbrial-gene probing. Journal of medical microbiology. 1990;32(3):145-52.
6. Dong H, Peng D, Jiao X, Zhang X, Geng S, Liu X. Roles of the spiA gene from Salmonella enteritidis in biofilm formation and virulence. Microbiology. 2011;157(Pt 6):1798.
7. Groisman EA, Ochman H. How Salmonella became a pathogen. Trends in microbiology. 1997;5(9):343-9.
8. Hosseininezhad B, Berizi E, Nader M, Mazloomi SM, Hosseinzadeh S, Ebrahimi L, Zare M. Prevalence of Salmonella contamination in consumed eggs in Iran: A systematic review and meta-analysis study on published studies from 1996 to 2018. Veterinary World. 2020;13(12):2743.
9. Huang K, Fresno AH, Skov S, Olsen JE. Dynamics and outcome of macrophage interaction between Salmonella Gallinarum, Salmonella Typhimurium, and Salmonella Dublin and macrophages from chicken and cattle. Frontiers in cellular and infection microbiology. 2020;9:420.
10. Jones MA, Wigley P, Page KL, Hulme SD, Barrow PA. Salmonella enterica serovar Gallinarum requires the Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system but not the Salmonella pathogenicity island 1 type III secretion system for virulence in chickens. Infection and immunity. 2001;69(9):5471-6.
11. Kabir SM. Avian colibacillosis and salmonellosis: a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. International journal of environmental research and public health. 2010;7(1):89-114.
12. Kang MS, Kim A, Jung BY, Her M, Jeong W, Cho YM, Oh JY, Lee YJ, Kwon JH, Kwon YK. Characterization of antimicrobial resistance of recent Salmonella enterica serovar Gallinarum isolates from chickens in South Korea. Avian pathology. 2010;39(3):201-5.
13. Kim K, Yoon S, Kim YB, Lee YJ. Virulence Variation of Salmonella Gallinarum Isolates through SpvB by CRISPR Sequence Subtyping, 2014 to 2018. Animals. 2020;10(12):2346.
14. Kipper D, Mascitti AK, De Carli S, Carneiro AM, Streck AF, Fonseca AS, Ikuta N, Lunge VR. Emergence, Dissemination and Antimicrobial Resistance of the Main Poultry-Associated Salmonella Serovars in Brazil. Veterinary Sciences. 2022;9(8):405.
15. Langridge GC, Fookes M, Connor TR, Feltwell T, Feasey N, Parsons BN, Seth-Smith HM, Barquist L, Stedman A, Humphrey T, Wigley P. Patterns of genome evolution that have accompanied host adaptation in Salmonella. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2015;112(3):863-8.
16. Lee YJ, Kim KS, Kwon YK, Tak RB. Biochemical characteristics and antimicrobials susceptibility of Salmonella gallinarum isolated in Korea. Journal of veterinary science. 2003;4(2):161-6.
17. Lu J, Li L, Pan F, Zuo G, Yu D, Liu R, Fan H, Ma Z. PagC is involved in salmonella pullorum OMVs production and affects

25. S Khaki P, Moradi Bidhendi S, Cheraghchi N. Study on phenotypic characteristics of Salmonella gallinarum and Sallmonella pullorum isolates based on biochemical and antimicrobial susceptibility tests in Iran. Archives of Razi Institute. 2015;70(3):171-7.
26. Sharifi-Mood B, Metanat M, Salehi M. Salmonella gallinarum empyema-the first case from Iran. Journal of Medical Sciences (Pakistan). 2006;6:180-2.
27. Tuhin AF, Kabir SL, Amin MM, Hossain KM. Identification and Antimicrobial Susceptibility of" Salmonella" species Isolated from Washing and Rinsed Water of Broilers in Pluck Shops. International Journal of Animal and Veterinary Advances. 2013;5(1):1-8.
28. Wales A, Lawes J. JMM Profile: Salmonella enterica serovar Gallinarum, biovars Pullorum and Gallinarum. Journal of Medical Microbiology. 2023;72(2):001653.
29. Zhang D, Zhuang L, Wang C, Zhang P, Zhang T, Shao H, Han X, Gong J. Virulence gene distribution of Salmonella Pullorum isolates recovered from chickens in China (1953–2015). Avian diseases. 2018;62(4):431-6.
30. Zhou X, Kang X, Zhou K, Yue M. A global dataset for prevalence of Salmonella Gallinarum between 1945 and 2021. Scientific Data. 2022;9(1):495.

biofilm production. Veterinary Microbiology. 2020;247:108778.
18. Mahdavi Z, Feizi A, Anzabi Y. Evaluating the antibiotic resistance pattern of Salmonella isolated from a number of laying poultry flocks in the northwest of the country during 2021 and investigating its relationship with the performance of the mentioned farms. Veterinary Clinical Pathology. 2023;16(64).
19. Mølbak K, Gerner-Smidt P, Wegener HC. Increasing quinolone resistance in Salmonella enterica serotype Enteritidis. Emerging infectious diseases. 2002;8(5):514.
20. Parvej MS, Nazir KN, Rahman MB, Jahan M, Khan MF, Rahman M. Prevalence and characterization of multi-drug resistant Salmonella Enterica serovar Gallinarum biovar Pullorum and Gallinarum from chicken. Veterinary World. 2016;9(1):65.
21. Pattison M, McMullin P, Bradbury JM, Alexander D, editors. Poultry diseases. Elsevier Health Sciences; 2007.
22. Prouty AM, Brodsky IE, Manos J, Belas R, Falkow S, Gunn JS. Transcriptional regulation of Salmonella enterica serovar Typhimurium genes by bile. FEMS Immunology & Medical Microbiology. 2004;41(2):177-85.
23. Rakov AV, Mastriani E, Liu SL, Schifferli DM. Association of Salmonella virulence factor alleles with intestinal and invasive serovars. BMC genomics. 2019;20(1):1-4.
24. Rotger R, Casadesús J. The virulence plasmids of Salmonella. International Microbiology. 1999;2:177-84.

Vol. 17 - No. 2
Fall & Winter 2023/2024

Iran. J. Vet. Clin. Sci.; 2024; 18(1):51-59.
http://doi.org/10.22034/IJVCS.2024.14571.1068

The degree of *Salmonella gallinarum* contamination in industrial poultry farms in the northwest of Iran and the pattern of antibiotic resistance and the frequency of some virulence genes

Masood Khakzadihe[1*]; Abdolkarim Zamani Moghaddam[2]; Mohammadreza Mahzounieh[3]

1. Resident, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
2. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
3. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.

Accepted: 27 February 2024 ***Received:*** 6 November 2023

Summary

Gallinarum disease caused by *Salmonella gallinarum* is one of the most challenging diseases in the poultry industry. In this study, the level of *Salmonella gallinarum* contamination of industrial chicken flocks in northwestern Iran, antibiotic resistance and frequency of some virulence genes (msgA, spiA, pagC) were investigated and evaluated. All the samples taken from the herds with suspected clinical symptoms of salmonellosis from the clinics of East Azarbaijan, West Azarbaijan, Ardabil and Zanjan provinces were examined and confirmed by microbial culture, chemical analysis, PCR and serological methods. After confirming the diagnosis of involvement with *Salmonella gallinarum*, antibiotic resistance was evaluated by disking method and the abundance of virulence genes in each isolate was checked. Of the 25 isolates of *Salmonella gallinarum* in this study, the highest microbial resistance was reported to tetracycline (76%), oxytetracycline (72%) and the highest sensitivity to amikacin (80%) and Fozbek (72%). 100% of the isolates were resistant to at least 6 types of antibiotics. In the study of the isolates, 8% had the msgA gene, 28% had the spiA gene, and 8% had the pagC gene, of which two isolates had all three virulence genes.

Keywords**:** *Salmonella gallinarum*, virulence gene, northwestern Iran, antibiotic resistance, industrial chicken

***Corresponding author:** masood.khakzadihe@gmail.com