مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۶، دوره ۷۲، شماره ...، ...-...
Original Article
DOI: 10.22059/jvr.2017.130431.2342

مطالعه میزان فراوانی آلودگی شغال‌های طلایی به سالمونلا با استفاده از روش‌های کشت میکروبی و PCR در استان‌های گلستان و مازندران

سمیه نمرودی[1*] حمید استاجی[2] سید وهاب شرفی[1]

۱) گروه محیط زیست، دانشکده شیلات و محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران
۲) گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

(دریافت مقاله: ۱۹ اردیبهشت ماه ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۲۴ مرداد ماه ۱۳۹۶)

چکیده

زمینه مطالعه: سالمونلاها از جمله پاتوژن‌های زئونوز بوده و طیف وسیعی از حیوانات اهلی و وحشی را آلوده می‌کنند. گوشتخواران فرصت طلب و همه چیز خوار چون شغال طلایی که معمولاً با تعداد بالا در نواحی روستایی پرسه می‌زنند، می‌توانند به عنوان منبع بالقوه آلودگی به سالمونلا برای انسان‌ها و سایر حیوانات اهلی و وحشی در شمال ایران عمل کنند. **هدف:** هدف از انجام این مطالعه بررسی میزان آلودگی شغال‌ها به سالمونلا و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌ها در استانهای گلستان و مازندران بود. **روش کار:** در سال‌های ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۴ نمونه مدفوع ۵۰ شغال تلف شده بر اثر تصادف با وسایل نقلیه جمع آوری و با استفاده از روش کشت میکروبی و PCR جهت بررسی آلودگی به سالمونلا مورد بررسی قرار گرفت و متعاقباً سروتیپ و الگوی مقاومت باکتریایی جدایه‌ها مشخص گردید. **نتایج:** با استفاده از روش کشت و PCR، ۵ نمونه مبتلا به سالمونلا (۱۰٪) که متعلق به ۲ سروتیپ،(۳/۵) *S typhymurium* و (۲/۵) *S arizona* بودند، در نمونه‌های مدفوع مورد شناسایی قرار گرفت. میزان آلودگی به سالمونلا در دو جنس نر و ماده مشابه بود و بیشترین میزان آلودگی در شغال‌های زیر ۲ سال دیده شد. ۲ جدایه *S typhymurium* و ۱ جدایه *S arizona* مقاومت آنتی بیوتیکی بالایی نسبت به آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین و آمپی سیلین نشان دادند. **نتیجه گیری نهایی:** آلودگی ۱۰ درصدی شغال‌های طلایی مورد مطالعه، بیانگر نقش فراموش شده این گونه در انتشار بیماری‌های مشترک و در معرض خطر قرار دادن سلامتی انسان‌ها در نواحی روستایی استان گلستان و مازندران می‌باشد. انجام مطالعات اپیدمیولوژیک جهت بررسی نقش حیوانات وحشی در انتشار سالمونلا و همچنین اجرای برنامه‌های مناسب جهت پیشگیری و کنترل سالمونلوز ضروری بنظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: شغال طلائی، سالمونلا، PCR

مقدمه

تبدیل روز افزون جنگل‌ها به زمین‌های کشاورزی در استان‌های شمالی ایران موجب افزایش حضور گوشتخواران وحشی بخصوص شغال ها، جهت تهیه غذا و حتی در برخی موارد پیدا کردن جفت در فصل جفت گیری، در نواحی روستایی و تماس نزدیک آن‌ها با جوامع انسانی در روستاهای شمال ایران شده است. شغال طلائی (*Canis aureus*) در بسیاری از کشورهای جهان چون کشورهای جنوب شرقی اروپا، بسیاری از کشورهای قاره آفریقا و خاورمیانه بوفور یافت می‌شود (۱۲).

شغال‌های طلائی حیواناتی همه چیز خوار بوده و عادات غذایی متنوعی دارند. حضور بالای آن‌ها در نواحی روستایی شمال ایران آن‌ها را تبدیل به رقیب‌های غذایی اصلی سگ‌های ولگرد - روستایی کرده است و بنظر می‌رسد به زندگی در این مناطق سازگاری بالایی پیدا کرده و تبدیل به حیواناتی نیمه اهلی شده اند.

همه چیزخوار بودن شغال‌ها یکی از عوامل بالا بودن تعداد آن‌ها نسبت به سایر گوشتخواران وحشی در اکثر نقاط دنیا و همچنین طبق منابع غیر رسمی در شمال ایران می‌باشد (۱۸).

نقش حیوانات وحشی در بروز بیماری‌های نوظهور و حفظ و انتشار عوامل بیماریزا در جوامع انسانی، به عنوان مخازن فاقد علائم بالینی، سال‌هاست که در برنامه‌های ریشه کنی بیماری‌های مشترک مطرح می‌باشد (۳۱).

با وجود اثبات نقش برجسته شغال‌ها در انتشار بیماری‌های زئونوز در جوامع انسانی بخصوص روستایی، لیشمانیوز- توبرکلوزیس- توکسوپلاسموز- هاری، مطالعات اپیدمیولوژیک کمی بر میزان آلودگی این حیوانات به انواع بیماری‌های مشترک در ایران و اکثر نقاط دنیا صورت گرفته است و اینطور بنظر می‌رسد که نقش مهم این حیوانات، در شکست برنامه‌های ریشه کنی کامل بیماری‌های زئونوز، از نقطه نظر بسیاری از اپیدمیولوژیست‌ها و محققین پنهان مانده است (۱۷،۳۴).

سالمونلوز از جمله بیماری‌های مشترک انسان و حیوان می‌باشد، علائم آن از یک انتریت ساده تا بروز سپتی سمی مرگ آور در افرادی که دچار کاهش عملکرد سیستم ایمنی می‌باشند، متغییر بوده و از نظر اقتصادی از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. به علت تنوع بسیار بالای مخازن حیوانی باکتری سالمونلا، حیوانات خونگرم و خونسرد، و همچنین مقاومت سالمونلا در محیط، بیماری سالمونلوز تبدیل به یکی از بزرگترین مشکلات بهداشت عمومی در سراسر دنیا شده است. محل اصلی حضور سالمونلا در دستگاه گوارش می‌باشد و بهمین دلیل منبع اصلی آلودگی محیط، مدفوع انسان و حیوانات می‌باشد. سالمونلاهای منتقل شده از طریق غذای آلوده بطور سالانه عامل بروز اسهال و عفونت‌های گوارشی در ۵ میلیون نفر در ایالات

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۱۷-۳۲۴۲۷۰۴۰ نمابر: ۰۱۷-۳۲۴۲۷۰۴۰ Email: snamroodi2000@yahoo.com

متحده آمریکا می‌باشند و البته سالمونلاهای منتقل شده از حیوانات نیز یکی از عوامل اصلی بروز سالمونلوز انسانی معرفی شده اند (۴،۵).

هیچگونه مطالعه‌ای در شمال ایران بر میزان بروز سالمونلوز در جمعیت‌های انسانی صورت نگرفته است و چه بسا با توجه به شرایط بهداشتی در نواحی روستایی شمالی ایران، میزان بروز سالمونلوز انسانی از ایالات متحده نیز بالاتر باشد.

همه سالمونلاهایی که حیوانات را آلوده می‌کنند، چه آن‌ها که دارای میزبان اختصاصی می‌باشند و چه آن‌هایی که میزبان اختصاصی ندارند، می‌توانند موجب بروز سالمونلوز سیستمیک در انسان‌ها شوند (۴).

سگ سانان اهلی و وحشی در بسیاری از موارد تبدیل به ناقلین فاقد علائم بالینی سالمونلوز شده و می‌توانند بمدت طولانی بصورت متناوب باکتری را متناسب با وضعیت جسمی از طریق مدفوع در محیط کنند. جداسازی سروتیپ‌های مشابه سالمونلا از انسان‌ها و حیوانات وحشی بیانگر نقش مهم حیوانات وحشی در انتقال سالمونلا به انسان می‌باشد (۱۱).

از طرف دیگر مقاومت آنتی بیوتیکی سالمونلاهای جدا شده از انسان‌ها و حیوانات یک مسأله رو به رشد بوده و مشکلات گسترده‌ای را در درمان سالمونلوز ایجاد کرده است. گزارشاتی از جداسازی سالمونلاهای مقاوم به آنتی بیوتیک از حیوانات وحشی چون سمور آبی که یک حیوان گوشتخوار می‌باشد، وجود داشته است و نگرانی‌ها در رابطه با نقش مهم پرندگان و پستانداران وحشی در انتشار سالمونلاهای مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها همچنان ادامه دارد (۲۴).

با توجه به اینکه شغال‌ها همانند سگ‌های اهلی به سالمونلا آلوده می‌شوند و در بسیاری از موارد ممکن است با وجود آلودگی تبدیل به مخزن به ظاهر سالم سروتیپ‌های زئونوتیک سالمونلا شوند، و همچنین با توجه به تعداد بالای آن‌ها در مناطق روستایی، به نظر می‌رسد جمعیت شغال‌ها در شمال ایران به عنوان یک پل ارتباطی بین حیات وحش و نواحی روستایی، بتوانند نقش مهمی در انتشار سالمونلا ایفا کنند (۴).

اهمیت این موضوع نه تنها در رابطه با بهداشت عمومی روستائیان در نواحی روستایی و دامهای اهلی مطرح می‌باشد، بلکه با توجه به افزایش استرس‌ها در اکوسیتم وحشی شمال ایران به علت کاهش منابع غذایی و از بین رفتن زیستگاه‌های طبیعی، در رابطه با حفظ حیوانات وحشی که با خطر انقراض نسل مواجه می‌باشند، چون پلنگ ایرانی و روباه ترکمنی، نیز بسیار حیاتی می‌باشد (۴،۷،۳۷).

با توجه به اهمیت بیماری سالمونلوز در انسان‌ها و حیوانات اهلی و وحشی، و حضور بالای شغال‌ها در نواحی روستایی شمال ایران جهت مشخص شدن نقش شغال‌های طلایی در انتشار سالمونلا، در این مطالعه به بررسی میزان آلودگی شغال‌های طلائی به سالمونلا (به عنوان نماینده سگ سانان وحشی) و تعیین سروتیپ و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌ها در ۲ استان گلستان و گرگان که در بسیاری نقاط دارای آب و هوای مشابه می‌باشند، پرداخته شد.

مواد و روش کار

نمونه گیری: با توجه به اینکه جهت دسترسی به شغال‌ها در حیات وحش لازم است حیوان زنده گیری شود و این عمل موجب بروز استرس در حیوانات می‌شود، طی سال‌های ۱۳۹۳ الی تابستان ۱۳۹۴، از تعداد ۵۰ لاشه تازه شغال تلف شده در جاده‌ها و یا ارجاع داده شده به اداره محیط زیست، نمونه برداری صورت گرفت.

کشت و سروتایپینگ: نمونه مدفوع تازه بلافاصله به محیط‌های غنی کننده چون سلنیت F، مک کانگی آگار و کری بلر انتقال داده می‌شد. بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری کلنی‌های مشکوک به محیط‌های اختصاصی رشد سالمونلاها چون شیگلا-سالمونلا منتقل شده و بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C قرار گرفتند.

سپس کلونی‌های مشکوک به سالمونلا، جداسازی و با انجام تست‌های بیوشیمیایی استاندارد نظیر سیمون سیترات TSI، SIM، MR-VP و اوره مورد شناسایی قرار گرفتند. باکتری جدا شده بر اساس ویژگی‌های بیوشیمیایی چون لاکتوز منفی، H2S مثبت، سیترات مثبت، متیل رد مثبت، هیدرولیز اوره منفی به عنوان یک جدایه متعلق به جنس سالمونلا محسوب می‌گردید.

جهت تعیین سروتیپ پس از کشت جدایه‌ها در محیط TSI، کلنی‌های تازه با سرم فیزیولوژی ۰/۸۵٪ مخلوط و با آنتی سرم‌های پلی والان O و H واکنش داده شده و در صورت مشاهده واکنش آگلوتیناسیون (در کمتر از ۲ دقیقه) سالمونلا بودن مورد تأیید قرار می‌گرفت. در ابتدا با استفاده از آنتی سرم‌های پلی والان مجموعه گروهی مشخص و سپس جهت تعیین سروتیپ از آنتی سرم‌های مونووالان متعدد استفاده گردید (۳۲).

PCR: جهت جداسازی سالمونلا از نمونه‌های مدفوع، در حد جنس، از روش PCR نیز استفاده شد. پرایمرهای یونیورسال

۱۱ ST (۵´ GCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA ۳´) و (۵´ GGTAGAAATTCCCAGCGGGTACTGC ۳´) ۱۵ ST مطابق با روش Soument و همکاران در سال ۱۹۹۹ مورد استفاده قرار گرفت (۲۹).

جهت استخراج DNA از روش جوشاندن استفاده و سالمونلا تیفی موریوم (ATCC ۱۷۳۰) و آب مقطر دیونیزه بترتیب به عنوان کنترل مثبت و منفی در این بررسی مورد استفاده قرار گرفت. اندازه قطعه تکثیر شده مورد انتظار bp۴۲۹ بود. واکنش PCR با ۳۵ سیکل حرارتی، با برنامه: ذوب اولیه = ۵ ثانیه در دمای ۹۴ °C، جداسازی= ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ °C، اتصال = ۴۵ ثانیه در دمای ۵۶ °C، گسترش = ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ °C و گسترش نهایی = ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ °C انجام شد. محصول حاصل از بر روی ژل آگارز ۱/۲ ٪ قرار گرفت و پس از الکتروفورز در زیر نور UV

عکس برداری شد.

بررسی الگوی مقاومت دارویی: جهت بررسی مقاومت دارویی ابتدا باکتری سالمونلا به محیط کشت مولر هینتون منتقل شد و پس از گسترش باکتری در تمام سطح محیط کشت بطور یکنواخت، دیسک‌های آنتی بیوتیکی (شرکت پادتن طب) استرپتومایسین (St)، جنتامایسین (GM)، نئومایسین (NM)، آمپی سیلین (Am)، نالیدیکسیک اسید (NA)، کلرامفنیکل (Cl)، تتراسایکلین (Tt)، فلوفنیکل (Ff)، در سطح محیط کشت قرار داده شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون میزان حساسیت و مقاومت بر اساس رشد و عدم رشد باکتری در اطراف دیسک‌های آنتی بیوتیکی بررسی گردید. قطر هاله‌های اطراف دیسک‌های آنتی بیوتیکی بر حسب میلیمتر به عنوان نتیجه آنتی بیوگرام ثبت و مطابق با استاندارد Quinn و همکاران در سال ۲۰۰۱ میزان حساسیت ثبت و نتیجه گیری گردید (۲۶).

مطالعات آماری: فاکتورهای مرتبط با سالمونلا مثبت شدن شغال‌های مورد مطالعه، سن، جنس، با استفاده از نرم افزار SPSS ۲۰ و آزمون مربع کاری با معنی دار در نظر گرفتن $p<۰/۰۵$، مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

در این مطالعه از ۵۰ شغال نمونه برداری شده، ۵ شغال معادل با فراوانی ۱۰٪ به سروتیپ‌های به *S typhymurium* (۳ عدد) و *S arizona* (۲ عدد) آلوده بودند. میزان آلودگی در ۲ جنس نر و ماده مشابه بوده $p>۰/۰۵$ و بیشترین میزان آلودگی در شغال‌های زیر ۲ سال مشاهده شد (جدول ۱). نتایج حاصل از دو روش مولکولی و کشت در تشخیص سالمونلا مشابه بود ($p>۰/۰۵$) (تصویر ۱). الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی متفاوتی در ۳ جدایه شامل ۲ =*S typhymurium* و ۱ = *S arizona* دیده شد (جدول ۲). بالاترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین و آمپی سیلین و بیشترین حساسیت نسبت به نالیدیکسیک اسید و فلوفنیکل مشاهده شد. تفاوتی در میزان آلودگی شغال‌ها در ۲ استان گلستان و مازندران مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$).

بحث

با وجود گزارش‌های متعدد از انتقال سالمونلا از گربه‌ها و سگ‌های اهلی به انسان، نقش گونه هایی از سگ سانان وحشی چون شغال‌ها که در مناطق روستایی در تماس نزدیک با حیوانات و انسان‌ها قرار دارند، در اپیدمیولوژی سالمونلا بسیار ناشناخته مانده است (۹).

آلودگی ۱۰ درصدی شغال‌های مورد مطالعه با در نظر گرفتن متوسط آلودگی ۲۸-۴ درصدی سگ‌های اهلی به سالمونلا، بیانگر میزان بالای تماس این حیوانات در محیط با باکتری سالمونلا می‌باشد و از طرف دیگر با توجه به دفع متناوب سالمونلا از مدفوع حیوانات آلوده و امکان تنها یکبار نمونه گیری در این تحقیق، بنظر می‌رسد آلودگی شغال‌ها در این ناحیه

جدول ۱. فراوانی آلودگی به سالمونلا بر اساس فاکتورهای سن و جنسیت.

فاکتورهای مورد بررسی	تعداد نمونه‌ها	تعداد و فراوانی مثبت‌ها
گروه سنی	زیر ۲ سال= ۱۵	زیر ۲ سال= ۳ (۲۰٪)
	۲-۵ سال = ۱۴	۲-۵ سال = ۱ (۷٪)
	بالای ۵ سال = ۲۱	بالای ۵ سال = ۱ (۴/۷٪)
جنسیت	نر = ۳۳	نر = ۳ (۹٪)
	ماده = ۱۷	ماده =۲ (۱۱/۷٪)
تعداد کل	۵۰	۵ (۱۰٪)

بالاتر از ۱۰ ٪ باشد (۳۶).

جداسازی باکتری سالمونلا از شغال‌ها در بازه سنی زیر ۲ سال تا بالای ۵ سال می‌تواند بیانگر تماس مداوم شغال‌ها با این باکتری و آلودگی بالای منطقه باشد (۳،۱۵).

آلودگی شغال‌های زیر ۲ سال به سالمونلا نسبت به شغال هایی که سن بالاتری داشتند، فراوان‌تر بود. در مطالعات صورت گرفته بر جمعیت سگ‌های اهلی چنین نتیجه‌ای ذکر شده و علت آن کاهش اختلال در عملکرد سیستم ایمنی حیوانات جوانتر نسبت به مسن ترها ذکر شده است (۱۹).

در مطالعه صورت گرفته بر جمعیت کایوت‌ها در مکزیک به عدم رابطه معنی دار بین فاکتورهای سن و جنسیت با آلودگی به سالمونلا اشاره شده است. در مطالعه حاضر نیز تفاوت معنی‌داری در آلودگی به سالمونلا در دو جنس نر و ماده مشاهده نشد (۲۲)

از طرف دیگر در مطالعه Mario و همکاران در سال ۲۰۱۴ بر روباه‌های قرمز در ایتالیا، ضمن بیان عدم وجود رابطه معنی دار بین آلودگی به سالمونلا و فاکتور سن، فاکتور جنسیت فاکتوری مؤثر بر میزان آلودگی روباه‌های قرمز به سالمونلا قلمداد شده است و علت تفاوت معنی دار در میزان آلودگی دو جنس نر و ماده به سالمونلا، تفاوت‌های رفتاری عنوان شده است (۲۱).

با وجود نقش مهم حیوانات وحشی در اپیدمیولوژی بیماری‌های زئونوز، مطالعات اپیدمیولوژیک صورت گرفته بر آلودگی حیوانات وحشی به سالمونلا بسیار محدود می‌باشد و اکثر مطالعات مشابه، گزارشات موردی از بروز سالمونلوز سیستمیک در گوشتخواران وحشی می‌باشد.

اولین و طبق مطالعات نویسندگان این مقاله، آخرین مطالعات صورت گرفته بر آلودگی شغال‌ها به سالمونلا طی ۲ تحقیق جداگانه در سال‌های ۱۹۷۶ و ۱۹۸۰ در کشور نیجریه صورت گرفته است و در هر دو مطالعه هیچگونه آلودگی به سالمونلا در شغال‌های مورد بررسی شناسایی نشده است (۱۰،۲۳).

عدم شناسایی سالمونلا در شغال‌های مورد بررسی در کشور نیجریه، دهه ۸۰ ، ممکن است به علت استفاده از روش هایی با حساسیت پائین در جداسازی سالمونلا و یا به علت شرایط نامناسب آب و هوایی کشور نیجریه جهت رشد باکتری سالمونلا در محیط باشد.

جدول ۲. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ۵ جدایه سالمونلای شناسایی شده. N: تعداد، S: حساس، I: مقاومت نسبی، R: مقاوم.

سروتیپ / آنتی بیوتیک	Ff	Tt	Cl	NL	Am	NM	GM	St
S typhymurium	S	I	S	S	S	S	S	S
S typhymurium	S	S	I	S	R	I	S	R
S typhymurium	S	S	S	S	R	S	S	R
S arizona	S	S	I	S	S	S	S	S
S arizona	S	I	I	S	R	S	I	R

سـویه غالب جدا شـده از نمونه مدفوع شـغال‌ها در مطالعه حاضر *S typhymurium* بـود. *S typhymurium* از جملـه سـالمونلاهای سـازگار نیافته با میزبانـی خاص بوده و اکثر حیوانات حونگرم و خونسـرد توانایـی حمـل آن را دارند بطوریکه آلودگی بـه *S typhymurium* به عنوان یکی از شایعترین علل بروز سالمونلوز انسانی معرفی شده است (۲۷). گزارشی از جداسازی این سروتیپ از شغال‌ها وجود ندارد اما مطالعات سایر محققین بیانگر آلودگی بالای سایر گونه‌های گوشتخواران و سگ سانان به *S typhymurium* بوده است .

در مطالعـه Gopee و همـکاران (۲۰۰۰) در جزیره ترینیـداد از ۱۴۱ حیوان وحشی در اسارت، (۱۲٪)۱۷عدد به سالمونلا آلوده بوده و مشابه نتایج این مطالعه *S typhymurium* سروتیپ غالب بود (۱۳).

همچنیـن در مطالعه صـورت گرفته بر جمعیت بالایـی از گونه‌های حیوانات وحشی در ایتالیا، سویه شایع در اکثر گونه‌ها *S typhymurium* معرفی و آلودگی ۵/۲ (۶۳/۱۲۲۲) درصدی روباه‌ها به سالمونلا گزارش شد (۶).

در مطالعـه صـورت گرفته در مکزیـک آلودگی به سـالمونلا در ۳۳ نمونه مدفوع از ۱۰۳ (۳۲٪) نمونه مدفوع تهیه شـده از کایوت‌ها تشخیص داده شـد. در این تحقیق بطور کلی ۲۹ نوع سـروتیپ سالمونلا از کایوتها جدا شـد و مشـابه مطالعه اخیـر بالاترین تعداد (۵) متعلق به سـروتیپ *S typhymurium* بود (۱۴).

آلودگی سـگ سـانان وحشـی به سایر سـروتیپ‌های سـالمونلا با فراوانی‌های متفاوت نیز در سـایر نقاط دنیا توسـط محققین گزارش شده است.

در مطالعـه صورت گرفته بر ۵۰۹ روباه قرمز در ایتالیا، ضمن گزارش جداسازی سروتیپ‌های مختلف سالمونلا از ۲۹ روباه قرمز معادل با ۵/۷٪ آلودگی، شایعترین سروتیپ‌های جدا شده بترتیب S. enterica subsp. enterica و *S typhymurium* بوده است (۲۱).

در مطالعـه دیگری که در نروژ بر روی ۲۱۵ روباه قرمز صورت گرفت، آلودگی ۶/۵٪ روباه‌ها به S Hessarek، S Kottbus، Salmonella enterica subsp. enterica, S. enterica subspecies IIIb:۶۱:k:۱,۵, و *S typhymurium* بـا غالبیـت بـا *S typhymurium* مورد شناسایی قرار گرفت (۱۶).

S arizona دومین سـروتیپ جدا شـده از شـغال‌ها در این مطالعه، بطور معمول خزندگان بویژه مارها را آلوده می‌کند اما در سایر حیوانات چون پرندگان و پستانداران نیز آلودگی به این سروتیپ گزارش شده است (۳۳).

اولین گزارش آلودگی به *S arizona* در گوشـتخواران وحشی از یک گربه وحشی که علائم سیستمیک سالمونلوز را نشان داده است، بوده است (۲۰).

همچنین در مطالعه صورت گرفته بر ۶۴ سـمور آبی در کشور پرتقال آلودگـی به *S arizona* و S galinarum در ۵ نمونه مدفوع شناسـایی شد (۲۴). گزارشاتی زیادی از آلوگی حیوانات خونگرم به *S arizona* وجود نداشته با این وجود گزارشاتی مبنی بر آلودگی انسان‌ها به این سروتیپ که قطعاً از طریق حیوانات به انسان منتقل شده است وجود دارد.

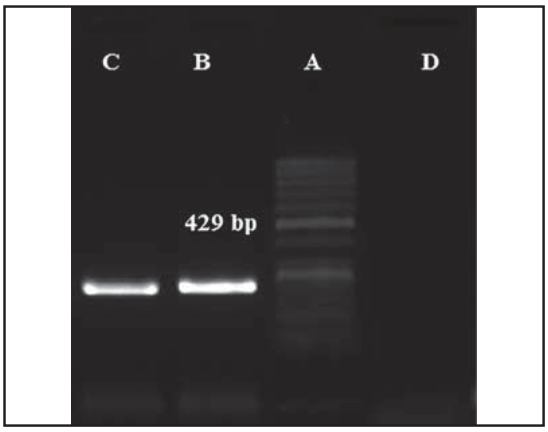
در مطالعـه Yousefi-Mashouf و Moshtaghi در سـال ۲۰۰۷ بر آلودگی انسان‌ها به سـالمونلاهای تیفوئیدی و غیر تیفوئیدی، ۱/۷٪ از آلودگی‌های غیر تیفوئیدی جامعه انسانی مورد بررسی ناشی از *S arizona* تشخیص داده شد (۳۵). در ایتالیا *S arizona* از یک فرد ۴۳ ساله مبتلا به سالمونلوز سیستمیک جدا شده است (۲).

با توجه به گزارشات آلودگی انسان‌ها به این سروتیپ احتمال انتشار *S arizona* توسط شغال‌ها و انتقال آن به روستائیان بعید به نظر نمی‌رسد.با توجه به مطالعات محدود انجام شده در شمال ایران ، متأسفانه منبع اصلی آلودگی شـغال‌ها به سروتیپ‌های شناسایی شـده را نمی‌توان با اطمینان معرفی کرد.

در شمال ایران، Emadi و همکاران در سال ۲۰۰۹، آلودگی پرندگان محلی- روستایی را به سروتیپ‌های سالمونلا تیفی موریوم و اینتریتیدیس گزارش کرده اند (۸).

هیـچ نوع اطلاعاتـی در نواحی مورد مطالعه در ایـن تحقیق در مورد وضعیت آلودگی سـایر مخازن به *S arizona* وجود ندارد، لذا منبع اصلی آلودگی شغال‌ها به سالمونلاهای جدا شده در این تحقیق را نمی‌توان بطور دقیق شناسـایی کرد. اما ممکن است سـالمونلاهای دفع شده از پرندگان اهلـی و وحشـی و چارپایان از طریق مصرف آب و غـذای آلوده وارد بدن شغال‌ها شده باشند (۱،۱۳).

مقاومت آنتی بوتیکی باکتری‌های مختلف در برابر آنتی بیوتیک‌ها در اوایل قرن نوزدهم ۲۰ ٪ تا ۳۰ ٪ گزارش شده است، اما با توجه به دسترسی



تصویر ۱. نتیجه محصول PCR = A: DNA مارکر B، ۱۰۰ bp : کنترل مثبت،C : نمونه مثبت،D : کنترل منفی.

بالا بــه آنتی بوتیک‌ها و مصــرف بی رویه آن‌ها مقاومــت آنتی بیوتیکی باکتری‌ها در دهه‌های أخیر تا ۷۰٪ برآورد شده است (۳۰).

همانگونه که اشاره شد در سایر مطالعات صورت گرفته بر حیات وحش گزارش هایی از جدا سازی باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک وجود داشته اســت، با این تفاوت که بر خلاف مطالعه حاضر، سالمونلاهای جدا شده از حیوانات وحشــی الگوی مقاومتی متوســطی را از خود نشان داده و توضیح این نتیجه عدم آنتی بیوتیک تراپی در حیوانات وحشی مورد بررسی عنوان شده است (۱۳،۲۴).

با توجه به اینکه می‌توان حدس زد، شــغال‌های مورد بررســی در این تحقیق نیز تحت آنتی بیوتیــک تراپی قرار نگرفته اند، و با توجه به اینکه آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین و آمپی سیلین از جمله آنتی بیوتیک‌های رایج در درمان بیماری‌های طیور و انســان‌ها می‌باشــند، بنظر می‌رسد که مقاومت آنتی بیوتیکی ســالمونلاهای جدا شــده از شغال‌ها ریشه در آنتی بیوتیــک تراپی بی رویــه در صنعت پرورش دام و طیــور و یا بیماری‌های انســان‌ها داشته باشد (۲۸). Olivera و همکاران در سال ۲۰۰۹، مقاومت بالای سالمونلاهای جدا شده از سمورهای آبی به آنتی بیوتیک‌های آمپی ســیلین، پنی سیلین و سفالکســین در پرتقال را گزارش کرده اند (۱۳). در مطالعه مشابه صورت گرفته در ایتالیا بر ۸۸ سالمونلای جدا شده از حیوانات وحشــی، بالاترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی نســبت به تتراســایکلین گزارش شد (۶).

مقاومت باکتری سالمونلا نسبت به آنتی بیوتیک‌ها در مناطق و مقاطع زمانی مختلف، بر اساس نوع، میزان و تداوم مصرف داروهای آنتی باکتریال متغییــر بوده و ثابت نمی‌باشــد. اما به هر حال مشــخص شــدن الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌ها در هر منطقه یک نشانگر بهداشتی مهم برای جدایه‌های باکتریایی می‌باشد (۸).

از طرف دیگر جداســازی ســالمونلاهای مقاوم به آنتی بیوتیک خطر گسترش این باکتری را از طریق شغال‌ها در نواحی روستایی و حیات وحش و همچنین اهمیت انجام آنتی بیوگرام قبل از اســتفاده از آنتی بوتیک‌ها را نشان می‌دهد (۲۴).

گزارش‌هایی از بروز سالمونلوز سیستمیک در حیوانات وحشی و متعاقب آن کاهش جمعیت حیات وحش وجود داشته است (۲۵).

با این وجود مشــخص شدن ارتباط بین جداسازی باکتری و اثر آن بر سلامت حیوانات نیاز به کنترل طولانی مدت علائم بالینی دارد که در حیات وحش این مورد براحتی امکان پذیر نمی‌باشد.

دسترسی به اطلاعات کافی از وضعیت سلامتی شغال‌های تازه تلف شــده در جاده‌ها برای نویسندگان مقاله وجود نداشت اما در معاینات بالینی نیز علائم سالمونلوز سیستمیک و یا انتریت در هیچک از شغال‌های نمونه گیری شده وجود نداشت. لذا بنظر می‌رسد شغال‌های آلوده به سالمونلا در این تحقیق در واقع ناقلین فاقد علائم بالینی ســالمونلا بوده باشــند و این واقعیت نقش مهم و خطرناک این حیوانات را دارای گستره حرکتی بالایی می‌باشند در انتشار سالمونلا را آشکار می‌سازد. نتایج این تحقیق برای اولین بار نمایی از وضعیت آلودگی حیوانات وحشــی به سالمونلا در ایران فراهم آورد، امید است که نتایج حاصله دید تازه‌ای از وضعیت آلودگی به سالمونلا در شــمال ایران، به عنوان یک منطقه مناســب جهت رشد این باکتری در محیط، برای محققین فراهم آورد.

جهت مشــخص شدن نقش شــغال‌ها در انتشــار و انتقال سالمونلا به حیوانات وحشــی، دام‌های اهلی و انســان‌ها و اجــرای هرچه موفقیت آمیزتر برنامه‌های پیشــگیری و کنترل بیماری سالمونلوز، انجام مطالعات اپیدمیولوژیک و مولکولی گسترده تر هم در جمعیت شغال‌ها و هم در سایر حیوانات اهلی و وحشی شمال ایران ضروری بنظر می‌رسد. از طرفی به نظر می‌رســد محدود کردن قلمرو حرکتی و دسترسی شغال‌ها به نواحی حضور انسان‌ها از طریق فنس کشی مناطق عبور این حیوانات، بتواند نقش مهمی در راستای کنترل بیماری هایی که این گونه به انسان‌ها منتقل می‌کند، و افزایش بهداشت عمومی در مناطق روستایی ایفا کند.

تشکر و قدردانی

نویســندگان مقاله کمال تشکر را نســبت به تمامی همکارانی که در سازمان‌های راه و ترابری و محیط زیست امکان دست یابی هرچه سریع‌تر به شغال‌های تلف شده بر اثر تصادف در جاده‌های استان گلستان و مازندران فراهم کردند، ابراز می‌دارند.

References

1. Ashbol, R., Kirk, M. D. (2006) Salmonella Mississippi infections in Tasmania: The role of native Australian animals and untreated drinking water. Epidemiol Infect. 134: 1257- 1265.
2. Bella, B., Capone, A., Bordi, E., Johnson, E.,

Musso, E., Topino, S., Petrosill, N. (2011) Salmonella enterica ssp. arizonae infection in a 43-year-old Italian man with hypoglobulinemia: a case report and review of the literature. J Med Case Rep. 5: 323 -9.

3. Bellan, S.E., Cizauskas, C. A., Miyen, J., Ebersohn, K., Ku¨ sters, M. (2012) Black jackals exposure to rabies virus, canine distemper virus, and *Bacillus anthracis* in Namibia. J Wild Dis. 48: 371-381.
4. Bengis, R.G., Kock, R.A., Fisher, J. (2002) Infectious diseases of animals: The wildlife/livestock interface', Scientific and Technical Review. Rev Sci Tech. 21: 53-65.
5. Bob, A. (2011) Food Net Estimate of the Burden of Illness Caused by Nontyphoidal Salmonella Infections in the United States. Cli Infect Dis. 38: 34-40.
6. Botti,V., Navillod, F.V., Domenis, L., Orusa, R., Pepe, E., Robetto, S., Guidett, S. (2013) Salmonella spp. and antibiotic-resistant strains in wild mammals and birds in north-western Italy from 2002 to 2010. Vet Ital. 49: 195-202.
7. Daszak, P., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D. (2000) Emerging infectious diseases of wildlife -Threats to biodiversity and human health. Science. 287: 443-449.
8. Emaddi Chashni, S.H., Hassanzadeh, M., Bozorgmehri Fard, M.H., Mirzaie, S. (2009) Characterization of the Salmonella Isolates from Backyard Chickens in North of Iran, by Serotyping, Multiplex PCR and Antibiotic Resistance. Arch Razi Ins. 64: 77-83.
9. Ersine, V.M., Duncan, D.A., Wendell, ME.E., Riggs, A., Billie, O. (1976) Canine Salmonellosis: A Review and Report of Dog to Child Transmission of Salmonella enteritidis. Am J Public Health. 66: 123-31.
10. Falade, S., Durojaiye, O. (1976) Salmonella isolated from captive animals in Ibadan, Western state of Nigeria. J Wild Dis. 12: 464-7.
11. Gast, R.K. (2008) Salmonella infection. In: Blackwell Publishing. Saif, Y.M., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Swayne, D.E. Diseases of poultry. (eds.). (12th ed.) Iowa. USA. p. 636-665.
12. Giannatos, G., Karypidou, A. Legakis, A., Polymeni, R. (2009) Golden jackal (Canis aures) diet in southern Greece. Mam Biol. 6: 34-9.
13. Gopee, N.V., Adesiyun, A.A., Caesar, K. (2000) Retrospective and Longitudinal study of salmonellosis in captive wildlife in Trinidad. J Wild Dis. 36: 284 - 293.
14. Gorski, L., Parker, C.T., Liang, A., Cooley, M.B., Jay-Russell, M.T. (2011) Prevalence, distribution, and diversity of Salmonella enterica in a major produce region of California. Appl Environ Microbiol. 77: 2734-2748.
15. Haydon, D.T., Cleaveland, S., Taylor, L.A., Laurenson L.A. (2002) Identifying reservoirs of infection: A conceptual and practical challenge. Emerg Infect Dis. 8: 1468-1473.
16. Handeland, K., Nesse, L.L., Lillehaug, A., Vikøren, T., Djønne, B., Bergsjø, B. (2008) Natural and experimental Salmonella Typhimurium infections in foxes (Vulpes vulpes). Vet Microbiol. 132: 129-134.
17. Khan, M., Khan, S.S., Bashu, J., Rima, U.K., Pervin, M., Hossain, M.Z., Habib, M.A. (2012) Visceral leishmaniasis is endemic in golden jackals of Bangladesh Agricultural University campus, a threat for expanding future zoonotic visceral leishmaniasis. Bangladesh. J Vet Med. 10: 97-105.
18. Krofel, M. (2007) Opportunistic hunting behavior of black-backed jackals in Namibia. African J Ecol. 46: 220-222.
19. Jalali, P.A., Beygi, M.D., Asadpoor, L. (2010) Isolation and antibiotic resistance of Salmonella from dogs with hemorrhagic enteritis. J Azad Uni. 9: 12-17.
20. Macri, N.P., Stevenson, G. W., Wu, C. C. (1997) Salmonella Arizona in a Lynx. J Wild Dis. 33: 909-11.
21. Mario, C., M., Ferrari, N., Giardiello, D., Lanfranchi, P., Zanoni, M. (2014) Isolation and identification of Salmonella spp. from red foxes (Vulpes vulpes) and badgers (Meles meles) in northern Italy. Acta Vet Scand. 34: 56-65.
22. Michele, T., Hake, A. F., Bengson, Y.,Thiptara,

A.,Nguyen, T. (2014) Prevalence and Characterization of Escherichia coli and Salmonella Strains Isolated from Stray Dog and Coyote Feces in a Major Leafy Greens Production Region at the United States-Mexico Border. PLoS One. 9: 1-13.

23. Okoh, A. E. J., Onazi, M. (1980) Note on salmonella isolation from wildlife in Kano zoological Gardens. J Wildlife Disease. 16: 7-10.
24. Oliveira, M., Pedroso, N.M., Sales, T.,Santos-Reis, M., Tavares, L., Vilela, C. (2010) Antimicrobial-Resistant Salmonella Isolated from Eurasian Otters (Lutra lutra Linnaeus, 1758) in Portugal. J Wildlife Disease. 46: 1257-61.
25. Pedersen, K., Clark, L., Andelt, W. F., Salman, M.D. (2006) Prevalence of Shiga toxin-producing Escherichia coli and Salmonella enterica in Rock Pigeons captured in Fort Collins, Colorado. J Wild Dis. 42: 46-55.
26. Quinn, P.J., Carter M.E., Mawkey, B.G.R. (2001) Clinical Veterinary Microbiology. Mosby. (2nd ed.) St Louis, United States.
27. Rbsch, W., Tschap, H., Baumle, A. J. (2001) Non- typhoidal Salmonellosis: emerging problems. Microbes Infect. 3: 237-47.
28. Schwarz, S., Kehrenberg, C., Walsh, T.R. (2001) Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. Int J Antimicrob Agents. 17: 431-437.
29. Soumet, C., Ermel, G., Rose, V., Rose, N., Drouin, P., Salvat, G., Colin, P. (1999) Identification by a multiplex PCR based assay of Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis strains from environmental swabs of poultry houses. Lett Appl Microbiol. 29: 1- 6.
30. Su, L.H., Chiu, C.H., Chu, C., Ou, J.T. (2004) Antimicrobial Resistance in Nontyphoid Salmonella Serotypes: A Global Challenge. Clin Infec Dis. 39: 546-551.
31. Thompson, R.C.A., Kutz, S.J., Smith, A. (2009) Parasite zoonoses and wildlife: emerging issues. Int J Environ Res Public Health. 6: 678-93.
32. Waltman, W.D., Gast, R.K., Mallinson, E.T. (1999) Salmonellosis. In: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. Swayne, D.E., Glisson, J.R., Jackwood, M.M., Pearson, J.E., Reed, W.M. (eds.) (4th ed.) American Association of Avian Pathologists. Pennsylvania. USA. p. 4-13.
33. Woodward, D.L., Khakhia, R., Johnson, W.M. (1997) Human salmonellosis associated with exotic pets. J Clin Mic. 35: 2786-90.
34. Yousuf, M. A., Bashu, J., Pervin, M., Islam, M.T., Das, P.Y. (2014) Identifying disease of golden jackals of Bangladesh agricultural university campus, Bangladesh. Bangl J Vet Med. 12: 217-224.
35. Yousefi-Mashouf, R., Moshtaghi, A.A. (2007) Frequency of Typhoidal and Non-Typhoidal Salmonella Species and Detection of Their Drugs Resistance Patterns. J Res Health Sci. 7: 49-56.
36. Zahrai Salehi, T., Askari Badouei, M., Madadgar, O., Ghiasi, S. R., Ahrafi Tamai, I. (2013) Shepherd dogs as common source for Salomonella enterica serovar Reading in Garmsar. Turkish J Vet Ani Sci. 37: 102-105.
37. Ziaee, H. (2008) Field Handbook of Iran's Mammals. Association with Wildlife Publisher. Introduction Wildlife Center Institute Publication. (2th ed.) Tehran, Iran. p. 142-50.

Original Article

Journal of Veterinary Research. 72,...:...-...,2017

Survey on Salmonella contamination of Golden Jackals by microbiological culture methods and PCR in Golestan and Mazandaran Provinces

Namroodi, S.[1*], Staji, H.[2], Sharafi, S.V.[1]

[1]*Department of Environmental Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Golestan, Iran*

[2]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Semnan, Semnan, Iran*

(Received 9 May 2017, Accepted 15 August 2017)

Abstract:

BACKGROUND: *Salmonella* spp. are zoonotic pathogens that infect a wide range of domestic and wild animals. Opportunistic wild carnivores such as Golden jackal (*Canis aureus*) which stray in high numbers around the rural areas can act as potential sources of *salmonella* spp in humans and wild & domestic animals in northern Iran. **OBJECTIVES:** The object of this survey was to examine the *Salmonella* spp infection including the antibiotic-resistant pattern in golden jackals in Golestan and Mazandaran Province. **METHODS:** Between 2013 and 2015, fecal samples of 50 road-killed Golden jackals (*Canis aureus*), were collected and analyzed for *Salmonella* contamination by classical microbiological culture methods and PCR followed by serotyping and determining of antibiotic resistant pattern. **RESULTS:** Five isolated salmonella belonging to 2 serotypes: *S typhymurium* (3/5) and *S arizona* (2/5) were isolated by culturing and PCR. The rate of salmonella contamination was similar between females and males and higher incidence was detected in jackals under 2 years old. **CONCLUSIONS:** 10% Salmonella infection of sampled golden jackals highlights the neglected role of this species in zoonotic diseases dissemination and poses a great threat to human health in rural areas of Golestan and Mazandaran Provinces. The epidemiological study on role of wild animals in the spread of salmonella and developing strategy for salmonellosis prevention and control seems necessary.

Keyword: golden jackals, Salmonella, PCR

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Salmonella contamination frequency base on gender and age.

Table 2. Antibiotic resistance pattern of 5 isolated Salmonella spp. N: Number, S: Sensitive, I: Intermediate resistant, R: Resistant.

Figure 1. Result of PCR = A: DNA ladder 100 bp, B: Positive control, C: Positive sample, D: Negative control.

***Corresponding author's email: snamroodi2000@yahoo.com, Tel: 017-32427040, Fax: 017-32427040**