Archive of SID

Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 12, Number 2 (May - June)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Prevalence and Comparison of *Salmonella* Serotypes in Indigenous and Industrial Chicken Eggs Collected from Khorramabad Using Culture and PCR Methods

Azar Doulat[1], Mohammad Reza Mahzounieh[1], Nemat Shams[2], Lida Etemdfar[2]

1. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
2. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran

Downloaded from ijmm.ir at 12:11 +0430 on Saturday September 8th 2018

Article Information

Article history:
Received: 2017/08/26
Accepted: 2018/05/16
Available online: 2018/06/30

Article Subject:
Clinical Microbiology

IJMM 2018; 12(2): 88-95

Corresponding author:

Lida Etemdfar
MSc of Bacteriology,
Department of Pathobiology,
Faculty of Veterinary
Medicine, Lorestan University,
Khorramabad, Iran
Tel: 09168424930
Email:
Lida.etemadfar@yahoo.com

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: Foodborne diseases are one of the major health and economic problems in industrialized and non-industrialized countries. *Salmonella* serotypes have been considered as one of the most important foodborne pathogens around the world. Poultry and eggs are considered as major sources for different pathogenic *Salmonella* serotypes. The aim of this study was to investigate prevalence of *Salmonella* contamination in indigenous and industrial chicken eggs in Khorramabad during 2015-2016.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, a total of 360 (180 indigenous and 180 industrial) eggs were collected from different part of Khorramabad area. The eggs were immediately transferred to microbiology laboratory in aseptic conditions. In order to determine *Salmonella*, after culture according to the reference conventional methods, the suspected colonies were confirmed using Serotyping and PCR

Results: The results showed that two samples of 180 indigenous eggs (1.1%) were contaminated to *salmonella*, but there was no contamination in industrial eggs.

Conclusions: The findings of the current study indicated that although *Salmonella* was not found in industrial egg samples but indigenous eggs produced in small farms may be harmful to consumers and cause the spread of *salmonella* contaminations in the environment.

Keywords: Prevalence, *Salmonella*, contamination, Eggs, PCR

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Doulat A, Mahzounieh M R, Shams N, Etemadfar L. Prevalence and Comparison of Salmonella Serotypes in Indigenous and Industrial Chicken Eggs Collected from Khorramabad Using Culture and PCR Methods. Iran J Med Microbiol. 2018; 12 (2): 88-95

www.SID.ir

Archive of SID

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۲ – شماره ۲ – خرداد-تیر ۱۳۹۷

Journal homepage: www.ijmm.ir

مقاله پژوهشی

بررسی شیوع و مقایسهٔ سروتیپ‌های *سالمونلا* در نمونه تخم‌مرغ‌های طیور بومی و صنعتی شهرستان خرم‌آباد با استفاده از کشت و PCR

آذر دولت[1]، محمدرضا محزونیه[1]، نعمت شمس[2]، لیدا اعتمادفر[2]

۱. گروه پاتوبیولوژی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲. گروه پاتوبیولوژی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۰۴

پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۲۶

انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۰۴/۰۹

موضوع:

میکروب شناسی بالینی

IJMM1397;12(2): 88-95

نویسنده مسئول:

لیدا اعتمادفر

کارشناس ارشد باکتری‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

تلفن: ۰۹۱۶۸۴۲۴۹۳۰

پست الکترونیک:

Lida.etemadfar@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: بیماری‌های منتقل‌شونده از طریق غذا، یکی از مشکلات اصلی بهداشتی و اقتصادی بین کشورهای صنعتی و غیرصنعتی هستند. سروتیپ‌های *سالمونلا* به‌عنوان یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های غذا زاد در سراسر دنیا در نظر گرفته شده‌اند. طیور و تخم‌مرغ منابع اصلی برای سروتیپ‌های مختلف بیماری‌زای *سالمونلا* در نظر گرفته می‌شوند. هدف از این مطالعه بررسی میزان شیوع آلودگی *سالمونلایی* در تخم‌مرغ‌های بومی و صنعتی در خرم‌آباد طی سال ۲۰۱۵ تا ۲۰۱۶ بود.

مواد و روش‌کار: در این مطالعهٔ مقطعی ـ توصیفی، در مجموع ۳۶۰ تخم‌مرغ (۱۸۰ بومی و ۱۸۰صنعتی) از نواحی مختلف خرم‌آباد جمع‌آوری شد. تخم‌مرغ‌ها بلافاصله تحت شرایط استریل به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل شدند. به‌منظور تعیین آلودگی *سالمونلایی*، پس از کشت براساس روش‌های متداول مرجع، پرگنه‌های مشکوک با استفاده از سروتایپینگ و PCR بررسی شدند.

یافته‌ها: نتایج حاکی از آن بود که ۲ نمونه از ۱۸۰ نمونه تخم‌مرغ بومی (۱/۱ درصد) با استفاده از تکنیک PCR آلودگی *سالمونلایی* داشتند؛ اما هیچ‌گونه آلودگی در تخم‌مرغ‌های صنعتی وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد اگرچه *سالمونلا* در تخم‌مرغ‌های صنعتی یافت نشد، اما تخم‌مرغ‌های بومی تولیدشده در مزارع کوچک ممکن است برای مصرف‌کنندگان خطرناک باشند و باعث گسترش *سالمونلا* در محیط شوند.

کلمات کلیدی: شیوع، *سالمونلا*، آلودگی، تخم‌مرغ، PCR

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

*سالمونلا*ها باکتری متحرک، گرم منفی و بی‌هوازی اختیاری متعلق به خانوادهٔ انتروباکتریاسه هستند. براساس جدول کافمن ـ وایت این جنس بیش از ۲۵۰۰ سروار (سروتیپ) دارد. سروارهای مختلف این باکتری در بسیاری از حیوانات از جمله گاو، خوک، اسب، پستانداران، خزندگان، دوزیستان و طیور (مرغ، اردک، غاز، بوقلمون) یافت می‌شوند. عفونت *سالمونلا* طی ۱۲ الی ۷۲ ساعت پس از قرارگیری در معرض آلودگی باکتریایی به‌طور معمول به شکل گاستروانتریت حاد ظاهر می‌شود. کودکان، افراد بالای ۶۵ سال و کسانی که دچار نقص سیستم ایمنی هستند، بیشتر در معرض خطر ابتلا قرار دارند و تظاهرات بیماری به صورت جدی‌تر از جمله سپتیسمی، عفونت مغز و مرگ بروز می‌کند. *سالمونلا* از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای منتقله از غذا در سراسر جهان در نظر گرفته شده است. *سالمونلا انتریکا* سروار تیفی موریوم و *سالمونلا انتریکا* سروار انتریتیدیس از جمله

www.SID.ir

Downloaded from ijmm.ir at 12:11 +0430 on Saturday September 8th 2018

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 12:11 +0430 on Saturday September 8th 2018

سرووارهایی‌اند که اغلب از بیماری‌های ناشی از موادغذایی جدا شده‌اند و شیوع گسترده‌ای در آسیا (کره، ژاپن و تایلند) دارند (۱،۲،۳). در بیشتر کشورهای اروپایی *سالمونلا انتریکا* دومین عامل عفونت‌های گوارشی باکتریایی شناخته شده است (۴).

طی سال‌های اخیر نیز، شیوع آلودگی انسانی و مسمومیت غذایی ناشی از *سالمونلا* به‌طور چشمگیری در اروپا، آمریکا و دیگر نقاط جهان افزایش یافته است. طیور یکی از منابع مهم انتقال *سالمونلا* هستند و ابتلای انسان به‌دنبال مصرف گوشت و تخم‌مرغ آلوده رخ می‌دهد (۴، ۵). لذا کنترل عفونت‌های *سالمونلا* برای سلامت طیور و صنایع تبدیلی غذا حائز اهمیت است. همچنین معیارهای مؤثر کنترل و پیگیری برای کاهش آلودگی *سالمونلا* در طیور ضروری به‌نظر می‌رسد. علاوه بر اهمیت بهداشت عمومی، آلودگی تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار به *سالمونلا* می‌تواند از راه افزایش تلفات در دوران جنینی و بعد از تولد و همچنین کاهش راندمان تولید موجب زیان اقتصادی فراوان شود (۶). *سالمونلا* در مرغ سه نوع بیماری ایجاد می‌کند که عبارتند از: بیماری پلوروم که عامل آن *سالمونلا پلوروم* است؛ تیفوئید مرغی که عامل آن *سالمونلا گالیناروم* است؛ عفونت‌های پاراتیفوئیدی نشأت‌گرفته از سرووارهای متعدد که باعث مسمومیت غذایی انسان می‌شوند مثل *سالمونلا تیفی موریوم* و *سالمونلا انتریتیدیس* (۷).

از وقوع سالمونلوزیس در انسان که منبع آن تخم‌مرغ‌های آلوده بوده است، به‌ویژه در مواردی که تخم‌مرغ خام یا نیم‌پز استفاده شده، گزارش‌های متعددی وجود دارد (۱). تخم‌مرغ ارزش غذایی بالایی دارد؛ چرا که تمام اسیدآمینه‌های ضروری را در بر می‌گیرد و سرشار از ویتامین‌ها و موادمعدنی است. علاوه بر این تخم‌مرغ یک منبع پروتئینی ارزان است؛ بنابراین میزان استفادهٔ فراوانی دارد (۴، ۸). زرده بستر مناسبی برای تکثیر باکتری‌ها در مقابل سایر اجزای تخم‌مرغ است؛ چراکه مکانیسمی برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها ندارد. علاوه بر این عفونت تخمدان‌ها باعث آلودگی *سالمونلایی* زرده از طریق نفوذ عفونت از پوستهٔ تخم‌مرغ آلوده و غشای زرده می‌شود. زمان ذخیره‌سازی و دما بر میزان نفوذ به زرده مؤثر است. اما سفیده حاوی مواد ضدمیکروبی است. در سفیدهٔ تخم‌مرغ غلظت بالای اووترانسفرین که از شلاتورهای آهن است، باعث مهار رشد باکتری‌ها می‌شود. همچنین لیزوزوم‌ها که پپتیدهای کاتیونی هستند قادر به اثرگذاری متقابل بر لیپوپلی‌ساکارید دیوارهٔ سلولی باکتری‌های گرم منفی هستند و باعث تشکیل منافذی می‌شوند که موجب نفوذ آلبومین به داخل سیتوپلاسم باکتری می‌شود. پوستهٔ تخم‌مرغ سالم که شامل پوست، غشای پوسته و لایهٔ ضخیم از موادی است که غشای پوسته را از آلبومین جدا می‌کند، به‌طور فیزیکی از نفوذ باکتری‌ها جلوگیری می‌کند (۸).

به‌طورکلی دو راه برای آلودگی تخم‌مرغ به *سالمونلا* وجود دارد. تخم‌مرغ‌ها می‌توانند از طریق نفوذ باکتری به پوستهٔ تخم‌مرغ از روده یا مدفوع آلوده طی یا پس از زمان تخم‌گذاری آلوده شوند (انتقال افقی). مسیر دوم آلودگی مستقیم زرده، سفیده، غشای پوسته و یا پوستهٔ تخم‌مرغ قبل از تخم‌گذاری است که منشأ آن آلودگی اندام‌های تناسلی به *سالمونلا* است (انتقال عمودی) (۱). با توجه به اینکه مرغ‌های محلی اکثرا در شرایط غیربهداشتی و غیرصنعتی پرورش می‌یابند و کنترلی هم بر تغذیهٔ آنها اعمال نمی‌شود، لذا تخم‌مرغ‌های حاصله می‌توانند حاوی آلودگی *سالمونلایی* بیشتری باشند. نظر به اهمیت سالمونلوزیس مرغ و تخم‌مرغ در ایجاد مسمومیت غذایی انسان، هدف از این مطالعه بررسی میزان شیوع سرووارهای مختلف *سالمونلا* در نمونه تخم‌مرغ‌های بومی و صنعتی شهرستان خرم‌آباد است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

این مطالعه به‌صورت مقطعی ـ توصیفی طی سال ۱۳۹۴ در دورهٔ زمانی ۶ ماهه (فصل پاییز و زمستان) انجام پذیرفت که در مجموع تعداد ۱۸۰ عدد تخم‌مرغ بومی از بازار و نقاط مختلف شهر خرم آباد و ۱۸۰ عدد تخم‌مرغ نیز از تنها مرغداری تخم‌گذار صنعتی فعال در خرم آباد جمع‌آوری شده و تحت شرایط استریل به آزمایشگاه انتقال یافتند.

کشت و جداسازی

برای مرحلهٔ پیش‌غنی‌سازی تحت شرایط استریل با کشیدن سوآب آغشته به سرم فیزیولوژی روی پوستهٔ تخم‌مرغ‌ها، از آنها نمونه تهیه و در محیط لاکتوز براث (تمامی محیط های کشت ساخت شرکت QUELAB, Germany) با حجم ۵ میلی‌لیتر کشت داده شد. به‌منظور نمونه‌برداری از زرده و سفیده، تخم‌مرغ‌ها به‌صورت جداگانه به‌منظور ضدعفونی سطح در داخل ظرف استریل حاوی الکل ۷۰ درصد (Merck, Germany) به‌مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند به نحوی که آسیبی به پوستهٔ آن وارد نشود. پس از خروج تخم‌مرغ‌ها از الکل، پوستهٔ آهکی تخم‌مرغ شکسته شده و زرده و سفیده در ظروف استریل از یکدیگر جدا شدند و مقدار ۱/۵ سی‌سی از زردهٔ هموژن‌شده برداشته و به محیط لاکتوز براث با

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 12:11 +0430 on Saturday September 8th 2018

حجم ۵ سی‌سی انتقال داده شد. برای سفیده نیز این مرحله انجام گرفت.

از یک تخم‌مرغ سه نمونه محیط لاکتوز براث حاوی زرده، سفیده و پوسته به‌دست آمد که به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C در انکوباتور نگهداری شد. در کل ۵۴۰ نمونه تخم‌مرغ صنعتی و ۵۴۰ نمونه تخم‌مرغ بومی در محیط لاکتوز براث پیش‌غنی‌سازی شد. به‌منظور غنی‌سازی از محیط سلنیت F و محیط تتراتیونات براث استفاده شد که میزان ۱ سی‌سی از محیط پیش‌غنی‌شده به ۹ سی‌سی از محیط‌های مذکور افزوده شد. محیط سلنیت F در ۳۷ درجه و محیط تتراتیونات براث در دمای ۴۲°C به‌مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. در ادامه یک لوپ از هرکدام از محیط‌های غنی‌شده به‌طور جداگانه بر محیط‌های افتراقی مکانکی آگار ، هکتون انتریک آگار ، SS و XLD کشت داده شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C قرار داده شد. برای تأیید کلونی‌های مشکوک به *سالمونلا* آزمایشات بیوشیمیایی از جمله کشت در سیمون سیترات ، اوره آگار (Merck, Germany)، TSI و MR-VP (Merck, Germany) انجام پذیرفت.

سروتایپینگ

برای تعیین گروه سرمی از کشت ۲۴ساعته و خالص باکتری در محیط TSI با استفاده از آنتی‌سرم‌های اختصاصی استفاده شد. به‌منظور آزمایش سرمی آگلوتیناسیون روی لام، از کیت سرمی اختصاصی *سالمونلای* تهیه‌شده از شرکت بهار افشان، طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد.

استخراج DNA

برای استخراج DNA، پرگنه‌های مشکوک به *سالمونلا* در محیط لوریا برتانی آگار کشت داده شدند و سپس از روش Boiling برای استخراج استفاده شد (۹). بدین منظور مقداری از کلونی باکتری را در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط کرده، به‌طوری که کدورتی معادل استاندارد نیم مک فارلند (معادل ۱/۵×۱۰^۸سلول) ایجاد شد. سپس میکروتیوب‌ها در دمای ۱۰۰°C به‌مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. پس از آن به‌مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ صورت گرفت و مایع رویی تا زمان انجام آزمون PCR در فریزر ۲۰- نگهداری شد.

تشخیص جنس *سالمونلا* با آزمون PCR

به‌منظور انجام آزمون PCR از پرایمرهای اختصاصی ژن *Inv A*(تهیه‌شده از سوی شرکت سیناژن) که کدکنندهٔ پروتئین غشای داخلی باکتری است و برای تهاجم باکتری به سلول‌های اپیتلیال ضروری است، استفاده شد (۱۰). ردیف بازهای پرایمرها و اندازهٔ محصول PCR در جدول ۱ ارائه شده است. در این بررسی از سویهٔ استاندارد *سالمونلاتیفی موریوم* (*S. typhimurium* ATCC: 14028) به‌عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

جدول۱. پرایمرهای استفاده‌شده برای شناسایی ژن *Inv A*

مرجع	طول محصول (bp)	ژن هدف	توالی پرایمر	پرایمر
۱۰	۲۸۴	*Inv A*	۵ ´-GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA-۳ ´	S139-F
			۵ ´-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC-۳ ´	S141-R

برای انجام PCR، ۱۲/۵میکرولیتر مسترمیکس (Ampliqon C Denmark)، ۲میکرولیتر DNA نمونهٔ مشکوک و یک میکرومول از پرایمرهای S139 و S141 با غلظت ۱۰پیکومول استفاده شد و سپس با آب دیونیزه حجم نهایی به ۲۵میکرولیتر رسانده شد. برنامهٔ زمانی و دمایی ترمال‌سایکلر (Primus 96 ,Germany) مطابق با جدول شماره ۲ انجام شد.

الکتروفورز محصولات PCR از سوی دستگاه الکتروفورز (Padideh Nojen Pars, Iran) بر ژل آگاروز ۱/۵٪ (Sigma, USA) و با استفاده از رنگ Safe Stain (SinaClon, Iran) انجام شد. ژل‌ها با استفاده از دستگاه ژل داک (Syngene, England) بررسی شدند.

برای تعیین سروارهای *سالمونلا انتریتیدیس*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *سالمونلا گالیناروم* و *سالمونلا پلوروم* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از پرایمرهای اختصاصی هریک از سروارها استفاده شد (جدول ۳). در رابطه با پرایمرهای استفاده‌شده برای سروارهای *سالمونلا پلوروم* و *سالمونلا گالیناروم*، پرایمر طراحی‌شده کدکنندهٔ بخشی از ژن *ratA* است که محصول آن برای *سالمونلا گالیناروم* ۱۰۴۷ bp و برای *سالمونلا پولوروم* ۲۴۳ bp است و می‌تواند دو سروار بررسی‌شده را از هم افتراق دهد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 12:11 +0430 on Saturday September 8th 2018

جدول۲. سیکل‌های حرارتی به‌منظور تکثیر ژن *Inv A*

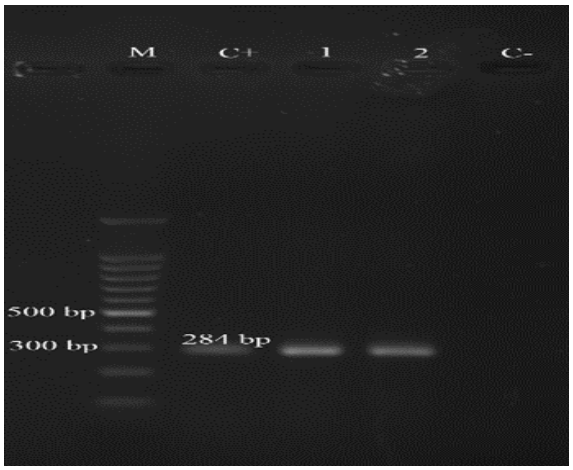
زمان	درجه حرارت (°C)	مراحل
۵ دقیقه	۹۵	Initial denaturation
۴۵ ثانیه	۹۵	Denaturation
۴۵ ثانیه	۵۶	Annealing
۴۵ ثانیه	۷۲	Extension
۷ دقیقه	۷۲	Final extension
۳۰		Cycle number

جدول۳. توالی پرایمرهای استفاده‌شده به‌منظور شناسایی سروواریهای *سالمونلا*

مرجع	طول محصول(bp)	ژن هدف	توالی پرایمر(3′→5′)	پرایمر	سروتیپ
۱۱	۱۸۳	*fliC*	ATAGCCATCTTTACCAGTTCCCCC	Flic-s	*سالمونلا تیفی موریوم*
			GCTGCAACTGTTACAGGAATATGCC	Flic-as	
۱۲	۳۱۰	*SefA*	GCAGCGGTTACTATTGCAGC	SefA2	*سالمونلا انتریتیدیس*
			TGTGACAGGGACATTTAGCG	SefA4	
۱۳	۱۰۴۷	*ratA*	GACGTCGCTGCCGTCGTACC	ratA Forward	*سالمونلا گالیناروم*
	۲۴۳		TACAGCGAACATGCGGGCGG	ratA reverse	*سالمونلا پلوروم*

یافته‌ها

از مجموع ۱۸۰ نمونه تخم‌مرغ بومی، ۱۸ عدد لاکتوز منفی بودند؛ اما از ۱۸۰ نمونه تخم‌مرغ صنعتی، نمونهٔ لاکتوز منفی جدا نشد. در ۱۸ نمونه لاکتوز منفی، با ارزیابی‌های صورت‌گرفته از طریق تست‌های بیوشیمیایی و محیط‌های کشت افتراقی هیچ پرگنه مشکوک به *سالمونلایی* مشاهده نشد. همچنین نتایج سروتایپینگ با استفاده از آنتی‌سرم‌های پلی‌والان گروه‌های A، B، C و D (آنتی‌سرم‌های پلی والان O شرکت بهارافشان، ایران) منفی بود. اما پس از بررسی با آنتی-سرم‌های O مونووالان تهیه‌شده از شرکت mast (mastassure, UK) دو نمونه *سالمونلا نیوایگتون* تشخیص داده شد. در آزمون PCR که با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *invA* برای تعیین جنس *سالمونلا* انجام گرفت، از ۱۸ نمونه لاکتوز منفی ۲ نمونه (یک زرده و یک سفیده) مثبت شدند (جدول ۴) که برای آنها باند ۲۸۴ bp قابل مشاهده بود (شکل ۱). دربارهٔ دو نمونهٔ مثبت آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به‌منظور شناسایی سروواریهای *سالمونلا انتریتیدیس*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *سالمونلاگالیناروم* و *سالمونلا پلوروم* صورت گرفت که هیچ‌یک از سروواریهای مدنظر مشاهده نشد.



شکل ۱. الکتروفورز محصولات PCR حاصل از تکثیر ژن *Inv A* به منظور شناسایی جنس سالمونلا. M: مارکر ۱۰۰bp، ستون‌های۱و۲: نمونه‌های مثبت، +C: کنترل مثبت، -C: کنترل منفی

جدول۴. میزان آلودگی *سلمونلایی* تخم‌مرغ‌های بومی با استفاده از PCR

نوع نمونه	تعداد نمونه (تخم‌مرغ بومی)	موارد مثبت	درصد آلودگی
پوستهٔ تخم‌مرغ	۱۸۰	۰	۰
زردهٔ تخم‌مرغ		۱	۰/۵
سفیدهٔ تخم‌مرغ		۱	۰/۵
مجموع		۲	۱/۱

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 12:11 +0430 on Saturday September 8th 2018

بحث

بررسی‌های انجام‌گرفته در مناطق مختلف ایران نشان داده است که شایع‌ترین سروارهای جداشدهٔ *سالمونلا* از تخم‌مرغ‌های آلوده، *سالمونلا آنتریتیدیس* و *سالمونلا تیفی موریوم* هستند (۵، ۳). در رابطه با آلودگی *سالمونلایی* تخم‌مرغ گزارشات نشان می‌دهد که در اسپانیا ۱ درصد، لهستان ۵ درصد، انگلستان ۷ درصد و هند ۱/۸ درصد آلودگی وجود دارد (۱۵). در ایران نتایج مطالعهٔ Mozaffari و همکاران (۱۳۹۲) به‌منظور بررسی آلودگی تخم‌مرغ‌های محلی و صنعتی به *سالمونلا* در تالش، نشان داد که ۱۹ درصد پوستهٔ تخم‌مرغ‌های صنعتی و ۴ درصد پوستهٔ تخم‌مرغ‌های محلی آلوده به *سالمونلا* ld هستند (۱۶) که با مطالعهٔ حاضر به‌دلیل جدانشدن *سالمونلا* از پوسته مطابقت ندارد؛ هرچند که جدایه‌های لاکتوز منفی از پوسته استخراج شد. جدانشدن *سالمونلا* از پوستهٔ تخم‌مرغ‌ها ممکن است به‌دلیل نبودِ آلودگی *سالمونلایی* در این منطقه و یا آلودگی با فراوانی اندک باشد که با این تعداد نمونه قابل شناسایی نبوده است. همچنین افراد به‌منظور بازارپسندی تخم‌مرغ‌های بومی اقدام به شستشوی تخم‌مرغ‌ها می‌کنند که خود باعث پایین آمدن بار میکروبی بر پوستهٔ تخم‌مرغ می‌شود.

همچنین در مطالعهٔ دیگری که از سوی Monadi و همکاران (۱۳۹۳)، برای تعیین آلودگی *سالمونلایی* تخم‌مرغ‌های بومی استان کهگیلویه و بویراحمد با استفاده از تکنیک PCR صورت گرفت، ۶/۶ درصد آلودگی به *سالمونلا* گزارش شد که ۳/۳۳ درصد آلودگی آن مربوط به پوسته و ۳/۳۳ درصد آلودگی مرتبط با زردهٔ تخم‌مرغ‌ها بود (۱۷). این نتایج اندکی با مطالعهٔ حاضر احتمالا به‌دلیل استفاده از تکنیک آزمایشگاهی مشابه و نزدیکی جغرافیایی مطابقت دارد. مطالعه‌ای از سوی Esmaeili و همکاران (۱۳۹۳) به‌منظور تعیین سروارهای *سالمونلا* در تخم‌مرغ‌های بومی استان گیلان با استفاده از کشت و خصوصیات بیوشیمیایی و سروتایپینگ انجام گرفته است که براساس آن آلودگی یک نمونه از پوسته و سه نمونه از محتویات تخم‌مرغ‌ها به *سالمونلا* گزارش شد. *سالمونلا*های جداشده متعلق به گروه سرمی C و D جدول کافمن ـ وایت بودند (۴).

در مطالعه‌ای که از سوی Moosavy و همکاران (۲۰۱۴) برای جستجوی جنس *سالمونلا* در تخم‌مرغ‌های تجاری شهر تبریز انجام پذیرفت، ۱/۳۳ درصد از پوستهٔ تخم‌مرغ‌ها آلودگی به جنس *سالمونلا* داشتند که سروار انتریتیدیس و تیفی موریوم بودند (۱).

البته نتایج آنها با مطالعهٔ ما همخوانی ندارد؛ زیرا در بررسی حاضر، باکتری *سالمونلا* از تخم‌مرغ‌های تجاری جدا نشد که این امر احتمالا به‌دلیل رعایت اصول بهداشتی است. در مطالعه‌ای دیگر که از سوی Zubair و همکاران (۲۰۱۷) با عنوان شیوع *سالمونلا* در تخم‌مرغ در داهوک با استفاده از کشت انجام شد، نتایج نشان داد که ۴/۸۵ درصد از پوستهٔ تخم‌مرغ‌ها به جنس *سالمونلا* آلوده هستند (۱۴).

آلودگی پوستهٔ تخم‌مرغ می‌تواند به‌علت رسوب مواد مدفوعی روی پوسته، انتقال از جعبهٔ تخم‌مرغ و یا لباس و دست کارگران، هنگام بسته‌بندی و ذخیره‌سازی، گردوغبار، محیط زیست، شرایط آب‌وهوایی و یا در حین حمل‌ونقل صورت پذیرد (۱۵). همچنین آلودگی پوسته می‌تواند در اثر مرطوب بودن پوسته، نگهداری در دمای محیط و در حین شکستن تخم‌مرغ به محتویات آن منتقل شود و باعث بروز مسمومیت غذایی در انسان شود (۴،۱۸). البته باکتری به‌طور مستقیم می‌تواند از تخمدان باعث آلودگی محتویات تخم‌مرغ شود.

طی بررسی‌ای که از سوی Fardows و همکاران (۲۰۱۵)، به‌منظور شناسایی باکتری‌های هوازی بیماری‌زا از پوستهٔ تخم‌مرغ و محتویات آن انجام گرفت، آلوده بودن به جنس *سالمونلای* ۶/۶۷ درصد از پوستهٔ تخم‌مرغ‌ها با استفاده از کشت میکروبی روشن شد؛ در صورتی که هیچ‌کدام از محتویات تخم‌مرغ‌ها با استفاده از کشت به‌منظور تشخیص آلودگی مثبت نبودند. اما با استفاده از تکنیک PCR، ۷ نمونه از محتویات تخم‌مرغ‌ها و ۱۴ نمونه از پوستهٔ تخم‌مرغ‌ها مثبت شدند که با مطالعهٔ حاضر به‌دلیل تفاوت در منطقهٔ جغرافیایی و روش بررسی همخوانی ندارد (۱۹). Moraes و همکاران (۲۰۱۶) که مطالعه‌ای به‌منظور بررسی جنس *سالمونلا* در تخم‌مرغ‌های تجاری سفید و قهوه‌ای شسته‌شده و شسته‌نشده با استفاده از کشت و qPCR در برزیل انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که در مجموع ۵/۴ درصد از نمونه‌ها با استفاده از آنالیز باکتریولوژی و ۱۶ درصد با استفاده از تکنیک qPCR برای جنس *سالمونلا* مثبت هستند. در این بررسی تکنیک به‌کاررفته در آزمون و روش بررسی با مطالعهٔ ما همخوانی ندارد (۸).

در مطالعهٔ Loongyai و همکاران (۲۰۱۱) که به‌منظور تشخیص *سالمونلا* در نمونه‌های تخم‌مرغی که از سیستم‌های مختلف نگهداری مرغ تخم‌گذار جمع‌آوری شده بودند، انجام پذیرفت، با استفاده از روش‌های معمول باکتری‌شناسی و آزمون

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 12:11 +0430 on Saturday September 8th 2018

PCR نشان داده شد که ۵ درصد از پوسته تخم‌مرغ‌ها به جنس *سالمونلا* آلوده هستند (۲۰). این مطالعات نشان می‌دهند که بین روش‌های تشخیصی، روش PCR به‌دلیل حساسیت و سرعت بالا، ابزاری مناسب و کارآمد برای تشخیص موادغذایی آلوده به *سالمونلا* است؛ چراکه قادر به تشخیص مقدار اندک DNA در نمونه است. با توجه به مطالعهٔ Bayhan oktem (۲۰۰۹) که در آنکارا به‌منظور شناسایی جنس *سالمونلا* در تخم‌مرغ و بررسی حیات باکتری در دمای یخچال و جوش صورت گرفت، ۶ درصد از نمونه‌ها آلوده به *سالمونلا انتریتیدیس* بودند. نتایج آنها نشان داد که با جوشاندن تخم‌مرغ به‌مدت ۸ دقیقه و پس از آن نگهداری در یخچال تا ۲۱ روز دیگر هیچ آلودگی *سالمونلایی* مشاهده نمی‌شود (۲۱). بنابراین می‌توان با نگهداری تخم‌مرغ در دمای یخچال رشد و تکثیر *سالمونلا* را به تأخیر انداخت. همچنین حرارت دادن تخم‌مرغ حداقل در دمای ۷۰ درجه به‌مدت ۱۰ دقیقه روش مناسبی برای جلوگیری از انتقال آلودگی است.

به‌طور کلی در خصوص مرغداری‌های تخم‌گذار صنعتی، نبودن آلودگی قابل پیش‌بینی بود؛ زیرا مزارع تخم‌گذار تجارتی و مزارع مادر تخم‌گذار و کارخانه‌های جوجه‌کشی تحت کنترل سازمان دامپزشکی هستند و تحت شرایط قرنطینه‌ای و آزمایشات دوره‌ای همچون آزمایشات ارگانولپتیک/ ظاهری (پوستهٔ خارجی تمیز، عاری از هرگونه آلودگی، ترک‌خوردگی و شکستگی و محتویات عاری از هرگونه بوی خارجی و گندیدگی یا علائم فساد) و آزمایشات میکروبی قرار دارند و با توجه به سیستم پرورش قفس که در این مزارع استفاده می‌شود، آلوده شدن تخم‌مرغ از بستر به حداقل می‌رسد.

اما در تخم‌مرغ‌های بومی وجود آلودگی دور از انتظار نبود که این امر ممکن است به‌دلیل آلودگی مرغان بومی با منشأ کلواک یا بستر آلوده باشد. اگرچه سبدهای حمل تخم‌مرغ، انسان آلوده و هرگونه عامل محیطی آلوده به *سالمونلا* که تخم‌مرغ با آن در تماس بوده نیز می‌تواند باعث آلودگی پوسته شود، اما آلودگی *سالمونلایی* سطح مرطوب تخم‌مرغ در زمان خروج از کلواک و تا قبل از خشک شدن در بستر می‌تواند به تثبیت آلودگی در پوسته بینجامد. بنابراین برنامه‌های کنترل و ریشه‌کنی *سالمونلا* باید دربارهٔ طیور بومی به‌منظور کاهش خطرات انتقال این باکتری انجام شود. با توجه به اینکه طیور سالم می‌توانند همواره باکتری *سالمونلا* را دفع کنند برای جلوگیری از شیوع بیماری آگاهی دادن به عموم مردم به‌ویژه روستاییان در رابطه با آلودگی *سالمونلایی* طیور، شستن دست‌ها پس از تماس مستقیم با طیور و پخت کامل تخم‌مرغ برای جلوگیری از بیماری کمک‌کننده هستند.

نتیجه‌گیری

هدف از انجام این مطالعه، بررسی میزان شیوع سروارهای *سالمونلا انتریتیدیس*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *سالمونلا گالیناروم* و *سالمونلا پلوروم* در تخم‌مرغ‌های طیور بومی و صنعتی شهرستان خرم آباد با استفاده از کشت و PCR بود. دو سویهٔ جدایه‌شده در این مطالعه با آنتی‌سرم‌های پلی‌والان گروه‌های A، B، C و D قابل شناسایی نبودند. هرچند تعلق آنها به جنس *سالمونلا* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تعیین جنس از طریق آزمون PCR به اثبات رسید. جدایه‌ها پس از تعیین سروار به دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه تهران ارسال شد و در نهایت با استفاده از آنتی‌سرم‌های O مونووالان به‌عنوان *سالمونلا نیواینگتون* تشخیص داده شدند.

سپاسگزاری

این پژوهش برگرفته از پایان‌نامهٔ دانشجویی مقطع کارشناسی ارشد است؛ لذا نویسندگان از مساعدت و همکاری معاونت پژوهشی دانشگاه لرستان و از دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه تهران تشکر و قدردانی می‌کنند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Moosavy MH, Esmaeili S, Bagheri Amiri F, Mostafavi E, Zahraei Salehi T. Detection of *Salmonella spp* in commercial eggs in Iran. Iran J Microbiol. 2015;7(1):50-4. PMID:26644874 PMCID:PMC4670468

2. Basler C, Nguyen TA, Anderson TC, Hancock T, Behravesh CB. Outbreaks of Human *Salmonella* Infections Associated with Live Poultry, United States, 1990–2014. Emerging Infect Dis. 2016;22(10):1705-11. https://doi.org/10.3201/eid2210.150765 PMID:27649489 PMCID:PMC5038410

3. Zahedi M, Rahimi E, Zahedi M, Momtaz H, Shojaii H. Prevalence of Salmonella enteritidis and S. typhimurium in marketed meat in Shahrekord in 2014. J Shahrekord Univ Med Sci. 2017;19(2):88-97.

4. Esmaeili H, Hamedi M, Salmonella's Serotypes in Domestic Eggs in Gilan Province. Iran J Infect Dis

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 12:11 +0430 on Saturday September 8th 2018

Trop Med. 2014;19(65):39-45. http://www.iiccom.org/JOURNAL/PDF/65/7.PDF

5. Madadi MS, Yousefi K. Experimental vertical transmission of different doses of Salmonella Enteritidis in Broilers chickens. Iranian Journal of Veterinary Clinical Sciences. 2016;9(2):69-77.

6. Jafari RA, Fazlara A, Dalirannia A, An investigation into Salmonella contamination of native hens' eggs in Ahvaz. Iranian Veterinary Journal. 2006;2(2):58-63. http://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?ID=93000

7. Oliveira SD, Santos LR, Schuch DMT, Silva AB, Salle CTP, Canal CW. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. Vet Microbiol. 2002;87(1):25-35. https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00028-7

8. Moraes DMC, Duarte SC, Bastos TSA, Rezende CLG, Leandro NSM, Café MB, et al. Detection of Salmonella spp. by Conventional Bacteriology and by Quantitative Polymerase-Chain Reaction in Commercial Egg Structures. Rev Bras Cienc Avic. 2016;18(1):117-24. https://doi.org/10.1590/18069061-2015-0063

9. Zahraei Salehi T, Tadjbakhsh H, Atashparvar N. Detection and identification of Salmonella Typhimurium in bovine diarrhoeic fecal samples by immunomagnetic separation and multiplex PCR assay. Zoonoses Public Health. 2007;54(6-7):231-6. https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2007.01061.x PMID:17803511

10. Rahn K, De grandis SA, Clarke RC, Mcewen SA, Galan JE, Ginoccho C, et al. Amplification of an invA gene sequence of Salmonella typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. Mol Cell Probes. 1992;6(4):271-9. https://doi.org/10.1016/0890-8508(92)90002-F

11. Lim YH, Hirose K, Izumiya H, Arakawa E, Takahashi H, Terajima J, et al. Multiplex polymerase chain reaction assay for selective detection of Salmonella enterica serovar Typhimurium. Jpn J Infect Dis. 2003;56(4):151-5. PMID:14583637

12. Pan TM, Liu YH. Identification of Salmonella Enteritidis isolates by polymerase chain reaction and multiplex polymerase chain reaction. J Microb Immunol Infec. 2002;35(3):147-51. PMID: 12380786

13. Lopes P, Neto OF, Batista D, Denadai J, Alarcon M, Almeida A, et al. Experimental infection of chickens by a flagellated motile strain of Salmonella enterica serovar Gallinarum biovar Gallinarum. Vet J. 2016;214:40-6. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.05.006 PMID:27387725

14. Zubair AI, Al-Berfkani MI, Issa AR. Prevalence of Salmonella species from poultry eggs of local stores in Duhok. Int J Res Med Sci. 2017;5(6):2468-71. https://doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20172430

15. Ghasemian Safaei H, Jalali M, Hosseini A, Narimani T, Sharifzadeh A, Raheimi E. The prevalence of bacterial contamination of table eggs from retails markets by Salmonella spp., Listeria monocytogenes, Campylobacter jejuni and Escherichia coli in Shahrekord, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2011;4(4):249-53.

16. Mozaffari NA, Rahmani Z, Iesazadeh K. Evaluation of the level of contamination with Salmonalla spp. In Red meat, Chicken, and Domestic and Industrial Eggs produced in Talesh City and assessment of their antibiotic resistance pattern, Iran. Qom Univ Med Sci J. 2013;7(5):60-5.

17. Monadi M, Kargar M, Naghiha A, Mohammadi R. Salmonella contamination of eggs of native Kohgiluyeh va Boyerahmad using PCR1 techniques and the evaluation of drug resistance. Armaghane Danesh. 2014;19(2):178-87. http://armaghanj.yums.ac.ir/article-1-445-en.html

18. Amin Zare M, Nairiz naghade M, Rasoli S, Delshad R. Isolation of Salmonella spp. from local egg yolks in Urmia. Clinical Research of Large Livestock. 2009;7(3):51-5. http://www.sid.ir/FileServer/JF/25713880708

19. Fardows J, Shamsuzzaman SM. Detection of potential pathogenic aerobic bacteria from egg shell and egg contents of hen collected from poultry. Bangladesh Med Res Counc Bull. 2015;41(2):67-72. https://doi.org/10.3329/bmrcb.v41i2.29983 PMID:29624284

20. Loongyai W, Wiriya B, Sangsawang N. Detection of Salmonella and Escherichia coli in Egg Shell and Egg Content from Different Housing Systems for Laying Hens. Int J Poult Sci. 2011;10(2):93-7. https://doi.org/10.3923/ijps.2011.93.97

21. Bayhan oktem A, Kaynak onurdag F, Buket ER, Demirhan b. A research of salmonella spp. In egg and egg products and survival of salmonella in different temperatures. Turk J Pharm Sci. 2009;6(3):147-54.

www.SID.ir